



Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Botânica
Pós-graduação em Botânica

**Caracterização de um promotor pólen-específico da família AP2/ERF de
mamona (*Ricinus communis* L.)**

THAÍS DE MOURA CIPRIANO

BRASÍLIA
2012

CARACTERIZAÇÃO DE UM PROMOTOR PÓLEN-ESPECÍFICO DA FAMÍLIA
AP2/ERF DE MAMONA (*Ricinus communis* L.)

Tese apresentada ao
Departamento de Botânica, do
Programa de Pós-graduação em
Botânica, da Universidade de
Brasília, como parte dos
requisitos necessários à
obtenção do título de Doutora em
Botânica.

THAÍS DE MOURA CIPRIANO

Orientador: Prof. Dr. Francisco José Lima Aragão

Brasília-DF

2012

CARACTERIZAÇÃO DE UM PROMOTOR PÓLEN-ESPECÍFICO DA FAMÍLIA
AP2/ERF DE MAMONA (*Ricinus communis* L.)

THAÍS DE MOURA CIPRIANO

Banca Examinadora

Dr. Francisco José Lima Aragão
Orientador

Dra. Gláucia Barbosa Cabral

Dr. Júlio Carlyle Macedo Rodrigues

Dr. Luiz Joaquim Castelo Branco Carvalho

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao meu
filho Luís Eduardo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por sempre iluminar meu caminho.

Ao meu filho por me trazer uma felicidade indescritível e por se ele a razão de todos os meus esforços. Aos meus pais, Eldes e Ivani, pelo amor incondicional e especialmente a minha mãe, pelo exemplo de luta, esperança e vitória. Ao Helvécio, por estar sempre presente nos momentos importantes. Aos meus irmãos, avós, tios e demais familiares que sempre torceram por mim.

Ao meu orientador Dr. Francisco Aragão pelos grandes ensinamentos, paciência, disponibilidade, dedicação, confiança e incentivo.

A Capes, pela concessão da bolsa de estudos e à Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia pela disponibilização das instalações físicas e equipamentos.

Aos membros da banca que fizeram preciosas sugestões.

A todos os professores e funcionários do Departamento de Botânica.

Aos grandes amigos do Laboratório de Transformação Genética de Plantas: Cristiana, Elsa, Aisy, Cristiane, Maria Laine, Angélica, Rebeca, Dona Izabel, Natália, Abdul, Pedro, Ana Zotta, Heitor, Andréia, Luís, Nayhanne, Leonardo, Mirella, Carolina, Roberto e Sérgio pelas conversas, apoio e momentos de descontração.

Agradeço a todos que, de alguma maneira, contribuíram para a conclusão desse projeto.

ÍNDICE

DEDICATÓRIA.....	IV
AGRADECIMENTOS	V
ÍNDICE DE FIGURAS E TABELAS.....	VIII
LISTA DE ABREVIATURAS	X
LISTA DE SITES UTILIZADOS PARA AS ANÁLISES <i>IN SILICO</i>	XI
RESUMO	XII
ABSTRACT	XIII
INTRODUÇÃO.....	14
A mamona (<i>Ricinus communis</i> L.)	14
O estresse ambiental e os fatores de transcrição DREB	18
OBJETIVO	27
Objetivos Específicos.....	27
MATERIAL E MÉTODOS.....	28
Clonagem e sequenciamento do gene <i>RcDREB1</i>	28
Obtenção do promotor <i>RcDREB1</i>	29
RACE-PCR	31
Análises filogenéticas.....	31
Análise de expressão por RT-PCR em mamona	32
Construção do vetor contendo o promotor <i>RcDREB1</i>	34
Transformação genética de plantas de tabaco	34
Tratamentos por estresse abiótico	36
Ensaio histoquímico do gene <i>gus</i>	37
Quantificação da expressão de GUS em grãos de pólen	38

RESULTADOS.....	39
Clonagem de um gene <i>DREB</i> de <i>R. communis</i>	39
Análise filogenética	42
Nível de transcritos <i>RcDREB1</i> em órgãos de <i>R. communis</i>	47
Expressão do gene <i>gus</i> sob o controle do promotor <i>RcDREB1</i>	48
DISCUSSÃO	55
CONCLUSÃO	61
PERSPECTIVAS.....	62
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	63
ARTIGO CIENTÍFICO	77

ÍNDICE DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1: Representação esquemática dos domínios da família AP2/ERF. Os membros da família AP2/ERF (AP2, RAV, CBF/DREB e ERF) possuem no mínimo uma repetição do domínio AP2/ERF. Apenas a subfamília RAV possui um domínio diferenciado chamado de B3 10

Figura 2: Sequência de nucleotídeos do promotor *RcDREB1*. A numeração é desde a primeira base do sítio de início da tradução (+1). O TATA putativo, boxes CAAT e o ponto de início da tradução ATG em caixas retangulares. Indicação dos elementos *cis* específicos de pólen (AGAAA e GTGA) marcados com fundo cinza e o *erd1* sublinhado 28

Tabela 1: Lista de elementos encontrados in silico no promotor *RcDREB1* 29

Figura 3: Análise filogenética da proteína RcDREB1 com outras proteínas AP2/ERF. A RcDREB1 foi agrupada na subfamília CBF/DREB. As sequências de aminoácidos dos domínios AP2/ERF foram alinhadas por Clustal W e a árvore filogenética foi construída usando o MEGA 5 com método Neighbor-Joining. A árvore inclui os domínios AP2/ERF disponíveis nos bancos de dados GenBank e TIGR. Os valores de consenso considerados para a árvore foram cut-off bootstrap > 50 30

Figura 4: Análise filogenética da proteína RcDREB1 com outras proteínas DREB. A RcDREB1 foi agrupada no subgrupo A-5. As sequências de aminoácidos foram alinhadas por Clustal W e a árvore filogenética foi construída utilizando o MEGA 5 com método Neighbor-Joining. A árvore inclui domínios AP2/ERF disponíveis nos bancos de dados GenBank e TIGR. Os valores de consenso considerados foram cut-off bootstrap > 50 32

Figura 5: Expressão do gene *RcDREB1* em grãos de pólen de flores masculinas de mamona. (1, 2) Um e dois dias antes da antese. (3) Durante a antese. (4) Dois dias após a antese. As bandas superiores amplificadas coincidem com o fragmento esperado do gene *RcDREB1* e as bandas inferiores correspondem à transcrição do gene *RcEF α* (fator de alongamento EF-1 α ; controle interno) 35

Figura 6: Desenho do vetor *pRcDREBGUS* utilizado para a transformação genética de tabaco. O promotor *RcDREB1*, em vermelho, controlando o gene *gus*, em amarelo. O vetor possui o gene *bar* que codifica para a proteína fosfinotricina acetiltransferase

36

Figura 7: Desenvolvimento de explantes foliares de tabaco após a transformação por *Agrobacterium*. (a) Explantes após a co-cultura. (b), (c) e (d) Regeneração de brotos na presença do agente seletivo GA. (e) Plântula de fumo em meio de enraizamento três meses posterior à transformação genética

36

Figura 8: Teste realizado com extrato de folhas de tabaco para detecção da proteína PAT. (1) Teste com uma planta transgênica, o aparecimento da linha inferior demonstra a presença da proteína PAT. (2) Controle negativo realizado com folha de tabaco não transformada, apenas a linha do controle negativo foi observada

37

Figura 9: Estágio de desenvolvimento da flor/micrósporo/pólen de tabaco e expressão do gene *gus* sob controle do promotor *RcDREB1*. (a) Anteras e os pistilos totalmente diferenciados (b) Cálice ligeiramente aberto na parte superior do botão. (c) Cálice aberto e corola. (d) Corola alongada com pétalas verdes e ligeiramente aberta. (e) Corola semiaberta e anteras e estigmas visíveis. (f) Flor completamente aberta, anteras deiscentes e corola expandida com cor rosa intenso, sendo o momento de maior expressão de GUS. (g, h) Flor em senescência. As setas indicam os grãos de pólen desidratados de c até h. A barra branca no painel superior corresponde a 1 cm (escala para as flores). A barra preta corresponde a 50 µm (escala para grãos de pólen)

40

Figura 10: Frequência de coloração azul em grãos de pólen, referentes à expressão do gene *gus* em relação aos estágios, a, b, c, d, e, f, g e h do desenvolvimento floral em tabaco. O pico de coloração azul encontra-se no estágio f que corresponde à antese floral e início do decréscimo a partir da fase g, correspondente à senescência

41

LISTA DE ABREVIATURAS

°C	graus Celsius
μ	micro (10^{-6})
ABRE	<i>ABA-Responsive Element</i>
AP2/ERF	<i>APETALA2/Ethylene Responsive Factor</i>
BAP	6-benzilaminopurina
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
CBF	<i>C-repeat Binding Factor</i>
cDNA	ácido desoxirribonucleico complementar
DNA	ácido desoxirribonucleico
dNTP	desoxinucleotídeos trifosfatos
DREB	<i>Dehydration Responsive Element Binding protein</i>
ERF/EAR	<i>Ethylene Responsive Factor/Associated Amphiphilic Repression</i>
L	litro
M	molar
mL	mililitros
n	nano (10^{-9})
NaCl	cloreto de sódio
pb	pares de base
PEG	Polietileno Glicol
RNA	ácido ribonucleico
rpm	rotação por minuto
RT	Transcriptase Reversa

LISTA DE SITES UTILIZADOS PARA AS ANÁLISES *IN SILICO*

PLACE: <http://www.dna.affrc.go.jp/htdocs/PLACE/>

PLANTCARE: <http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>

MEME 4.7.0: <http://drmotifs.genouest.org/2011/12/meme-4-7-0-update/>

CLUSTAL W: <http://www.clustal.org/clustal2/>

MEGA 5: <http://www.megasoftware.net/>

NEIGHBOR-JOINING: <http://www.icp.ucl.ac.be/~opperd/private/neighbor.html/>

TARGET P: <http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>

NLSTRADAMUS: <http://www.moseslab.csb.utoronto.ca/NLStradamus/>

NETSTART: <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetStart/abstract.php/>

GenBank: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/>

RESUMO

Os fatores de transcrição (TF) chamados de DREB pertencem à grande família AP2/ERF e tem envolvimento em interações proteína-proteína e ligação com o DNA. As proteínas AP2/ERF têm funções importantes na regulação da transcrição de genes de uma grande variedade de processos biológicos relacionados com o crescimento e desenvolvimento, bem como várias respostas a estímulos ambientais, regulando a expressão de genes vegetais que respondem a estresses bióticos e abióticos. Neste estudo, um fator de transcrição AP2/ERF (chamado de *RcDREB1*) foi isolado de mamona (*Ricinus communis* L.) e sua expressão foi analisada em sementes em desenvolvimento, folhas, caules e flores (sépalas, anteras e ovários) de plantas cultivadas sob condições de campo. Os transcritos foram detectados em grãos de pólen, com um pico durante a antese. A sequência de aminoácidos do *RcDREB1* foi comparada com outras proteínas AP2/ERF TF e apresentou identidade de 38-78%. A análise filogenética resultou na classificação desse gene como um membro da subfamília CBF/DREB, sendo enraizado juntamente com genes do subgrupo A-5. O promotor *RcDREB1* foi fusionado com o gene repórter *gus* e utilizado para transformar tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) por *Agrobacterium tumefaciens*. As plantas transgênicas foram submetidas a vários tratamentos de estresse abiótico (temperaturas baixas e elevadas, seca, salinidade e ABA exógeno) e nenhuma expressão de GUS foi detectada, sugerindo que o promotor *RcDREB1* não é ativo nas condições testadas. As análises *in silico* revelaram a presença de três cópias do elemento regulador pólen-específico (AGAAA) na região 5' do *RcDREB1*. A expressão de GUS foi observada somente em grãos de pólen, começando durante a abertura da flor e permanecendo no início do processo de senescência, no qual, grãos de pólen maduros são liberados das anteras. Além disso, os grãos de pólen desidratados também expressaram o gene *gus*. Este é o primeiro estudo sobre um gene *DREB* apresentando expressão pólen-específica.

ABSTRACT

DREB transcription factors (TF) belong to the superfamily of AP2/ERF and their involvement in protein-protein interactions and DNA binding has been proposed. AP2/ERF proteins have important functions in the transcriptional regulation of a variety of biological processes related to growth and development, as well as various responses to environmental stimuli, regulating expression of plant biotic and abiotic stress-responsive genes. In this study an transcription factor AP2/ERF (named *RcDREB1*) was isolated from castor bean (*Ricinus communis* L.) and its expression was analyzed in developing seeds, leaves, stems and flowers (sepals, anthers and ovaries) of plants cultivated under field conditions. Transcripts were only observed in pollen grains, peaking during anthesis. The *RcDREB1* deduced amino acid sequence was compared to other AP2/ERF TF proteins and presented 38–78% identity. Phylogenetic analysis classified it as a member of the CBF/DREB subfamily, rooting with the subgroup A-5. The *RcDREB1* promoter was fused to the *gus* reporter gene and used to transform tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) using *Agrobacterium tumefaciens*. Transgenic plants were exposed to various abiotic stress treatments (low and high temperatures, drought, salinity and exogenous ABA) and no detectable GUS expression was observed, suggesting that the *RcDREB1* promoter is not active under tested conditions. *In silico* analyses revealed the presence of three copies of the regulatory late pollen-specific element (AGAAA) in the *RcDREB1* 5'-region. GUS expression was only observed in pollen grains, starting when the flower opened and initiating the senescence process; at this point, desiccated mature pollen grains are released from anthers. In addition, dehydrated developing pollen grains also expressed the *gus* gene. This is the first study on a *DREB* gene presenting pollen-specific expression.

INTRODUÇÃO

A mamona (*Ricinus communis* L.)

A mamona pertence à ordem *Geraniales*, família *Euphorbiaceae*, ao gênero *Ricinus* e espécie *communis*. Existe uma grande variedade de mamoneiras com seis subespécies e vinte e cinco variedades botânicas, além de diversas cultivares comerciais e híbridos em todo o mundo (Moshkin, 1986).

A origem da mamona ainda é muito discutida porque existem relatos muito antigos de seu cultivo na África Oriental e também na Índia (Moshkin, 1986). A diversificação de um grande número de variedades desta planta, encontradas tanto no continente africano como no asiático, dificulta o estabelecimento de uma procedência efetiva da mamona. No Brasil, os primeiros relatos demonstram que a mamona foi introduzida pelos portugueses que utilizavam seu óleo para iluminação e lubrificação de eixos de carroças (Chierice & Claro Neto, 2001).

É uma espécie oleaginosa de relevante importância econômica. O óleo extraído de suas sementes apresenta inúmeras aplicações na área industrial, como produção de cosméticos, lubrificantes, composição de plásticos e tintas, mas o grande destaque é na produção de biocombustível renovável e biodegradável (Ribeiro, 2006; Santos *et al.*, 2007). Além do óleo extraído das sementes, a cadeia produtiva gera outros subprodutos, como a torta de mamona, que um resíduo da extração do óleo, utilizada para alimentação animal e também para adubação orgânica (Chierice & Claro Neto, 2001).

A mamoneira é encontrada e cultivada nas mais variadas regiões do mundo devido sua facilidade de propagação e capacidade de adaptação em diferentes condições climáticas (Beltrão *et al.*, 2007). A mamona é encontrada em vastas áreas tropicais e subtropicais, principalmente em zonas áridas, onde as temperaturas bastante elevadas permanecem por toda a estação de crescimento, que gira em torno de 140 a 180 dias (Moshkin, 1986). No Brasil, podemos encontrá-la em quase toda extensão territorial como planta nativa ou em cultivos destinados à produção de óleo. O cultivo é favorecido principalmente em regiões semiáridas brasileiras, uma vez que a mamona apresenta a característica de ser tolerante à seca, além de possuir um fácil manejo. É uma planta exigente em calor, necessitando de períodos secos para o desenvolvimento e maturação dos frutos, sendo sensível ao excesso de umidade no solo (Kouri, *et al.*, 2004).

A mamoneira é uma planta com grande diversidade em termos de tamanho, coloração das folhas e do caule, porte, hábito de crescimento, conteúdo de óleo nas sementes e tamanho das sementes (Weiss, 1983).

O caule é cilíndrico, pode ser de coloração verde, arroxeada, cinza, marrom e vermelha, com presença ou não de cera, rugosidade e nós bem definidos, com cicatrizes foliares proeminentes (Moshkin, 1986). A haste principal cresce verticalmente sem ramificação até o surgimento da primeira inflorescência, que tem a denominação de cacho ou racemo, com um número variável de frutos, dependendo da cultivar e do ambiente (Beltrão, 2002).

As folhas também apresentam variações na cor, que vão de verde claro até vermelho escuro, dependendo da presença do pigmento antocianina; são longas,

com pecíolo fistuloso e comprido, com glândulas nectaríferas, alternas e peltadas. A largura do limbo pode variar de 10 a 40 cm, podendo chegar a até 60 cm de comprimento (Rodrigues *et al.*, 2002).

A inflorescência de mamona é um racemo monóico, com flores femininas localizadas no ápice das flores e as masculinas encontram-se na base. As flores são dispostas em grupos sobre racemos opostos às folhas. As flores femininas são providas de estilete e estigma trifido e bifurcado e densamente papiloso. As flores masculinas são constituídas por numerosos estames com filetes ramificados e anteras com tecas globulares separadas (Rodrigues *et al.*, 2002). Essas flores masculinas expõem o pólen pela deiscência das anteras que ocorre muito rapidamente, com liberação dos grãos de pólen em um período de 3 a 5 minutos o que acontece com violenta explosão (Moshkin, 1986). O pólen arremessado é arrastado pelas correntes aéreas para as flores femininas da mesma planta ou para as inflorescências de outras plantas, procedendo-se à polinização, que é predominantemente anemófila (Savy Filho, 1999).

A planta de mamona é considerada do tipo misto quanto ao sistema reprodutivo, podendo variar entre autofecundação e cruzamento natural, com taxas de alogamia variando de acordo com o seu porte. Nas plantas com porte anão (até 1,5 m) ou médio (2,0 m), a taxa de fecundação cruzada é de aproximadamente 25%. Para as de porte alto (acima de 2,5 m), esta taxa atinge aproximadamente 40%. Estes índices podem, também, ser afetados pelo tipo de ramificação, aberta ou fechada (Savy Filho, 1999).

O fruto desta planta é uma cápsula tricoca, podendo apresentar diferenças quanto ao aspecto externo, isto é, muito papiloso, pouco papiloso, inerme liso e inerme rugoso e também formas variáveis em tamanho. Quanto à deiscência dos frutos, podem se classificar em: indeiscentes, semideiscentes e deiscentes (Weiss, 1983).

A semente também pode ter uma variação em formatos e cores, podendo ser arredondada ou elipsoide, com superfície dorsal arqueada e proeminente carúncula. A parte interna do tegumento corresponde a uma membrana delgada clara sobre a amêndoa que é representada por endosperma oleoso, muito desenvolvido, que envolve um embrião provido de dois cotilédones (Rodrigues *et al.*, 2002).

A viabilidade do pólen é um dos fatores mais importantes e que têm impacto direto sobre o sucesso da fecundação e da produção de sementes, sendo um componente significativo de produtividade da cultura. No momento em que os grãos de pólen são liberados das anteras, muitas vezes, têm de lidar com o estresse ambiental. Portanto, a proteção dos grãos de pólen contra circunstâncias ambientais adversas é crucial. Estudos sobre mecanismos moleculares envolvidos na sobrevivência do pólen durante a dispersão e na polinização são de grande relevância ecológica e agronômica e a mamona pode ser uma excelente planta modelo.

O estresse ambiental e os fatores de transcrição DREB

O estresse ambiental pode ser ocasionado por influências desvantajosas exercidas sobre uma planta por fatores bióticos ou abióticos. Os fatores bióticos envolvem a interação entre organismos vivos como patógenos, algas ou plantas daninhas. Já o estresse abiótico é causado por fatores climáticos, como altas ou baixas temperaturas, excesso ou falta de água, alta concentração salina e também por componentes químicos (Qureshi *et al.*, 2007). Um determinado estresse ambiental que afeta uma planta pode não ser estressante para outra. Os efeitos do estresse são avaliados em relação à sobrevivência da planta, produtividade de uma cultura e ao desenvolvimento em geral. As plantas têm desenvolvido características adaptativas contra esses estresses. O processo inicial envolve a exposição prévia ao fator de estresse abiótico ou biótico e torna a planta mais resistente em uma futura exposição (Bruce *et al.*, 2007). Isso pode ocorrer pela ativação de mecanismos de defesa. A resposta ao estresse por meio do desenvolvimento de mecanismos de defesa é a mais crucial função da célula vegetal e ocorre através da alteração no modelo de expressão gênica (Qureshi *et al.*, 2007).

As plantas evoluíram por meio de uma variedade de respostas adaptativas e moleculares, tais como redução do fechamento de estômatos, diminuição na inibição da fotossíntese e da transpiração e também no atraso na senescência foliar (Valente *et al.*, 2009). Alterações na transmissão de metabólitos ou de fatores de transcrição poderiam fornecer uma explanação de como o metabolismo

das plantas é alterado por meio da exposição a variados estresses. A expressão gênica modulada por estresse abiótico, em geral, altera a quantidade de muitos transcritos e de proteínas (Saibo *et al.*, 2009). Dependendo do seu potencial, o déficit hídrico, poderá ocasionar diversas consequências que conduzem a uma série de alterações fisiológicas, genéticas, morfológicas e moleculares, que podem causar danos irreparáveis ao vegetal (Bray, 1993; Mahajan & Tuteja, 2005).

As alterações climáticas que vêm ocorrendo por causa do aquecimento global também seriam relevantes no âmbito de tolerância vegetal a diferentes estresses. Diversos pesquisadores têm demonstrado esforços em busca do entendimento da fisiologia vegetal para a obtenção de cultivares tolerantes principalmente à seca, pois a falta de água é o principal fator limitante para a produção mundial de alimentos. Sabe-se que o déficit hídrico altera uma variedade de processos fisiológicos e bioquímicos que podem alterar a fotossíntese, a síntese de proteínas e o acúmulo de solutos (Qureshi *et al.*, 2007, Saibo *et al.*, 2009). Os principais efeitos da desidratação para as plantas são: mudanças no volume celular; redução da divisão e no turgor celular; desnaturação de proteínas; abscisão foliar; fotossíntese limitada no interior dos cloroplastos; aumento na concentração de solutos; aumento da concentração do hormônio ácido abscísico (ABA) e fechamento estomático em resposta a presença desse hormônio (Taiz & Zeiger, 2004).

Alguns *motifs* responsáveis pela sinalização nos promotores *DREB* são relacionados com a presença de cálcio, de luz, açúcar e hormônios (Srivastav *et al.*, 2010). O hormônio de maior importância na relação estabelecida entre as

plantas e as várias classes de estresse é o ácido abscísico (ABA) devido a sua capacidade de regulação da transdução de sinais e da expressão gênica. Diferentes caminhos de transdução de sinais foram postulados para rotas que apresentam interação com ABA, caminhos independentes da presença de ABA e um caminho onde estão presentes genes responsivos às duas condições (Magalhães Júnior, 2010).

Atualmente existem inúmeros genes específicos identificados como protetores dos vegetais quando submetidos a uma condição de estresse biótico ou abiótico. Os produtos desses genes podem ser classificados em dois diferentes grupos: as proteínas funcionais e as proteínas reguladoras. No grupo das proteínas funcionais estão as aquaporinas (movimento da água na membrana plasmática), enzimas osmoprotetoras (acúmulo de solutos no citosol, turgor celular), proteínas protetoras de macromoléculas em membranas como a LEA (*Late Embryogenesis Abundant proteins*), as chaperonas moleculares, como HSP 70 BiP (70 kDa *Heat Shock Binding Protein*) e as proteínas anticongelamento. As enzimas detoxificantes também estão presentes na resposta gênica, neutralizando radicais livres provenientes do estresse oxidativo. Já no grupo das proteínas reguladoras, estão presentes as proteínas quinases e os fatores de transcrição (Shinozaki & Yamaguchi-Shinozaki, 1997).

As proteínas reguladoras caracterizam-se pela regulação da transdução de sinais e da expressão gênica. Os fatores de transcrição são proteínas que reconhecem sequências específicas presentes nos promotores de diferentes genes induzidos pelo déficit hídrico, alta concentração salina, estresse pelo frio ou

por aquecimento e são regulados por rotas de sinalização que ocasionam a ativação desses fatores de transcrição. Os fatores de transcrição (TF) chamados de DREB pertencem à grande família de fatores de transcrição AP2/ERF. Cada proteína DREB contém um domínio altamente conservado, chamado de APETALA2/*Ethylene Responsive Factor* (AP2/ERF), que consiste numa sequência de 60 a 70 aminoácidos. Tem sido sugerido o envolvimento deste domínio em interações proteína-proteína e ligação com o DNA. O nome APETALA2 é destinado ao fator de transcrição AP2, que em *Arabidopsis*, é responsável por promover o estabelecimento do meristema floral, a especificidade de identidade de órgãos florais, como sépalas e pétalas, e também regulação temporal e espacial da expressão do gene homeótico floral (Jofuku *et al.*, 1994; Dinh *et al.*, 2012). O AP2 é relacionado com o ERF na regulação da expressão do gene ao nível da transcrição. Estudos têm demonstrado que um domínio AP2/ERF é suficiente para a atividade de ligação específica de uma sequência de DNA (Ohme-Takagi & Shinshi, 1995).

Em ERF o domínio se liga especificamente ao *box* GCC de 11 pb do elemento de resposta ao etileno (ERE), que é um elemento promotor essencial na capacidade de resposta ao etileno. As proteínas AP2/ERF têm importantes funções na regulação da transcrição de genes em uma variedade de processos biológicos relacionados com o crescimento e desenvolvimento, bem como várias respostas a estímulos ambientais, que regulam a expressão de genes de plantas responsivos a estresses bióticos e abióticos (Agarwal *et al.*, 2006; Sharoni *et al.*, 2011). Esses fatores de transcrição da família AP2/ERF também têm sido

relacionados com envolvimento na regulação de processos que vão desde o crescimento vegetativo até a floração (Zhang *et al.*, 2012).

As proteínas AP2/ERF constituem uma grande família que foi dividida em subfamílias (chamadas AP2, RAV, CBF/DREB e ERF) com base nas semelhanças de suas sequências e nos números de domínios de ligação AP2/ERF (Nakano *et al.*, 2006; Xu *et al.*, 2011). Os membros das subfamílias AP2/ERF possuem pelo menos uma repetição do domínio AP2/ERF (Figura 1).

As proteínas da subfamília AP2 possuem duas repetições do domínio AP2/ERF e desempenham a função de regulação de processos no desenvolvimento vegetativo e reprodutivo de plantas (Elliott *et al.*, 1996; Chuck *et al.*, 1998; Boutilier *et al.*, 2002).

Já as proteínas da subfamília RAV contêm um único domínio AP2/ERF em combinação com o domínio B3, que é um conservado domínio de ligação de DNA em outros fatores de transcrição específicos de plantas. Embora seja possível ligar o DNA com um único domínio, uma afinidade muito mais elevada de ligação de DNA é conseguida quando ambos os domínios estão presentes. O domínio AP2/ERF num membro da subfamília RAV-like se liga a um motivo CAACA, enquanto que o domínio B3 liga-se a uma sequência CACCTG (Kagaya *et al.*, 1999, Nole-Wilson & Krizek, 2000).

Os fatores de transcrição da subfamília ERF possuem apenas um domínio AP2/ERF e estão envolvidos principalmente em resposta a estresses bióticos, como patogênese, ao reconhecer o elemento *cis-acting* AGCCGCC, conhecido

como *box* GCC (Hao *et al.*, 1998). Em tabaco, a família ERF possui pelo menos 239 fatores de transcrição (Rushton *et al.*, 2008).

As proteínas CBF/DREB também possuem apenas uma repetição do domínio AP2/ERF. Essas proteínas são responsáveis por ligar os elementos *cis-acting* DRE/CRT (*Dehydration Responsive Element/C-repeat*) nas regiões promotoras de muitos genes relacionados com o estresse hídrico e induzem a sua expressão, a qual, por sua vez promove tolerância ao estresse em plantas (Khan, 2011). O DRE/CRT *motif* (CCGAC) é encontrado na região promotora de muitos genes induzidos por frio e déficit hídrico (Huang *et al.*, 2008)

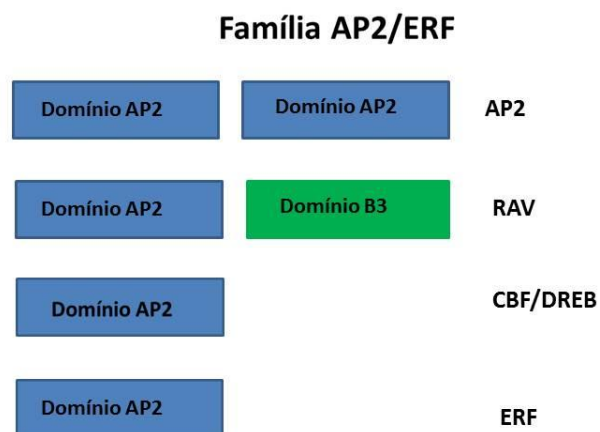


Figura 1. Representação esquemática dos domínios da família AP2/ERF. Os membros da família AP2/ERF (AP2, RAV, CBF/DREB e ERF) possuem no mínimo uma repetição do domínio AP2/ERF. Apenas a subfamília RAV possui um domínio diferenciado chamado de B3.

O DRE/CRT foi identificado como um elemento *cis* essencial no promotor *RD29A* para expressão em resposta à desidratação e ao frio, independente da presença de ABA. Esse promotor chamado de *RD29A* (*Responsive to Dessication*) tem sido muito caracterizado e é constituído por uma sequência DRE de nove pares de base, TACCGACAT que regula a sua indução sob condições de déficit hídrico, baixas temperaturas e estresse salino (Yamaguchi-Shinozaki & Shinozaki, 1994; Kasuga *et al.* 2004). Os fatores de transcrição interagem com o DRE/CRT, levando à indução da expressão gênica. Esses fatores foram isolados de *Arabidopsis* e denominados como DREB1A (DREB- *Dehydration Responsive Element-Binding protein*), DREB1B, DREB1C e DREB2A, DREB2B. Sendo que DREB1A, DREB1B, DREB1C são induzidos pelo estresse ocasionado pelo frio, e o DREB2A e DREB2B por condições de estresse hídrico e alta concentração salínica (Dubouzet *et al.*, 2003). A superexpressão do promotor CaMV 35S controlando o DNA de DREB1A ou de CBF1/DREB1B, demonstraram aumento da tolerância à seca (Qureshi *et al.*, 2007).

As proteínas da subfamília CBF/DREB são divididas em seis subgrupos de acordo com a similaridade de domínios AP2: A-1, A-2, A-3, A-4, A-5 e A-6 (Sakuma *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2008). A expressão do gene *AtDREB1A/AtCBF3* (A-1) é induzido por baixa temperatura, mas não por seca e nem por excesso de sal, enquanto que os genes *AtDREB2A* (A-2) são induzidos por estresse hídrico e salino, mas não por baixa temperatura (Liu *et al.*, 1998). Outros genes *DREB*, tais como o *AtTINY2*, que pertence ao subgrupo A-4 (Wei *et*

al., 2005), o *GhDBP1*, A-5 (Huang & Liu, 2006), o *GmDREB2*, A-5 (Chen *et al.*, 2007) e *ZmDBF1*, A-6 (Kizis & Pages, 2002) também foram caracterizados como proteínas induzidas por estresse, uma vez que são responsivos à presença de ácido abscísico.

Os fatores de transcrição da subfamília CBF/DREB foram identificados e caracterizados em várias espécies de plantas e estão associados tanto com a resposta ao stress abiótico e biótico como também com o controle do florescimento (Chuck *et al.*, 1998). O tabaco tem sido extensivamente utilizado em estudos envolvendo a expressão de *DREB* em diversas condições de estresses abióticos (Ohme-Takagi & Shinshi, 1995; Shen *et al.* 2003; Kasuga *et al.* 2004). Em um estudo realizado com plantas transgênicas de tabaco expressando o gene *GmDREB2*, classificado no subgrupo A-5, sob o controle do promotor CaMV 35S, verificou-se aumento de tolerância a seca e um grande acúmulo de prolina, além das plantas não apresentarem anormalidades fenotípicas como relatado anteriormente em diversas outras plantas com expressão constitutiva de genes *DREB* tais como retardamento no crescimento vegetativo com a introdução do gene *AtDREB1A* em *Arabidopsis* e também no tabaco (Khan, 2011). Em geral, os genes da subfamília CBF/DREB têm sido muito estudados em *Arabidopsis* (Sakuma *et al.*, 2002) e poucos membros têm sido caracterizados em plantas tropicais, como por exemplo, em plantas de feijão comum (Cortés *et al.*, 2012), nos quais a maioria das suas funções ainda não foi determinada. Além disso, apesar das numerosas investigações fisiológicas para descobrir como os fatores de transcrição DREB regulam os genes alvo, a regulação da transcrição dos

próprios genes *DREB* ainda não foi totalmente caracterizada (Zhang *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2011). Sabe-se muito pouco sobre a sua expressão espacial durante o desenvolvimento dos órgãos vegetais submetidos ao estresse ambiental. Portanto, existe a necessidade de descobrir como esses fatores de transcrição funcionam durante a regulação de um gene específico de maneira temporal e espacial.

A elucidação da função dos genes de tolerância ao estresse e também do processo de defesa vegetal nessas condições é de fundamental importância para a obtenção de variedades agrícolas mais resistentes, o que conseqüentemente poderá contribuir para a redução de perdas nas lavouras em adversas condições climáticas.

OBJETIVO

O objetivo principal deste estudo foi isolar e caracterizar a expressão de um promotor da subfamília CBF/DREB de mamona (*Ricinus communis* L.).

Objetivos Específicos

- Determinar a expressão do gene em diferentes tecidos vegetais;
- Caracterização do promotor e avaliação da resposta ao estresse;
- Construção de um vetor quimérico com o promotor *DREB* de mamoma fusionado ao gene repórter *gus*;
- Transformação de plantas de tabaco via *Agrobacterium*, com o vetor *pRcDREBGUS*, sob o controle do promotor *DREB* de mamona;
- Análise das linhagens geneticamente modificadas;
- Realização de bioensaios para avaliação da expressão do promotor em linhagens transgênicas de tabaco submetidas a condições de estresse abiótico.

MATERIAL E MÉTODOS

Clonagem e sequenciamento do gene *RcDREB1*

O DNA genômico total foi isolado a partir de folhas de mamona, utilizando o Dneasy Planta Mini Kit (Qiagen Valencia, CA, EUA). *Primers* degenerados DREB392 (5'-GCGACGTCRTGGRCACGAGCGGC-3') e DREB297 (5'-TGGGTGGSGGAAATTAGAGARCC-3') (R = G ou A, S = G ou C) baseados em regiões conservadas de genes *DREB* de plantas disponíveis no GenBank, foram utilizados para amplificar uma sequência interna do gene *RcDREB*. As reações de Polimerase em Cadeia (PCR) foram realizadas em um termociclador (MyCycler Thermal Cycler, BioRad), em 50 µL de volume contendo 50 ng de DNA, 60 mM de Tris-SO₄ (pH 8,9), 18 mM (NH₄)₂SO₄, 2 mM de MgSO₄, 250 nM de cada dNTP, 200 nM de cada *primer* e 5 U/µL de Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen). A reação foi tratada a 95 °C (5 min) e submetida a 35 ciclos de amplificação (95 °C durante 1 min, 55 °C durante 1 min, 68 °C durante 1 min) com um ciclo final de alongamento de 5 minutos a 68 °C. Os experimentos geraram 42 clones do *RcDREB1* que foram clonados no vetor pGEMT Easy (Promega) e posteriormente sequenciados pela empresa MacroGen Inc (Coreia). Na análise de similaridade de sequências obteve-se um fragmento de 845 pb com grande similaridade com outros genes *DREB* de *Arabidopsis*.

Obtenção do promotor *RcDREB1*

A região flanqueadora 5' do gene *RcDREB1* foi obtida por PCR *Thermal Asymmetric Interlaced* (TAIL-PCR) de acordo com Liu *et al.* (1995), com uma modificação essencial, a utilização de *primers* de 10 nucleotídeos aleatórios em vez de 16 nucleotídeos degenerados como *primers* curtos. Com base na sequência de DNA do fragmento de 1025 pb de um gene *RcDREB1*, foram construídos dois *primers* gene específicos em posições *nested* (RCNESTEDR: 5'-AACAGGAGCGAATAAGAACC-3'; RCR2: 5'-ATCCTTGACCGCTTGTTTC-3'). Vinte *primers* arbitrários de 10 nucleotídeos foram obtidos na empresa Operon Biotechnologies GmbH (www.operon.com). Três séries de TAIL-PCR foram realizadas no termociclador MJ Investigator (PTC-100), utilizando o produto diluído da PCR anterior como molde para a outra, e, consecutivamente, empregando um *primer* arbitrário comum e *primers nested* gene específicos.

O TAIL-PCR primário foi realizado em 25 µL de reação contendo 20 ng de DNA genômico, 10 µM de *primer* OPE 10 mer, 600mM Tris-SO₄ (pH 8,9), 18 mM (NH₄)₂SO₄, 50 mM de MgSO₄, 10 mM de dNTP, 5 U/µL da Platinum Taq High Fidelity (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). Foram utilizados os *primers* arbitrários em combinação com o *primer* específico DREB292. O produto final da reação primária foi diluído na proporção de 1:50 e o da reação secundária em 1:100. Estes foram utilizados como moldes nas reações secundárias e terciárias,

respectivamente. Além disso, para cada reação foi desenvolvido um programa específico para a amplificação do fragmento.

A reação secundária de TAIL-PCR foi realizada com o *primer* gene específico RCNESTEDR em combinação com o mesmo *primer* arbitrário usado no PCR primário. A solução da reação foi idêntica a do PCR primário, com exceção de que 1 µL da diluição de 50 vezes do produto do PCR primário foi usado como molde.

Para o TAIL-PCR terciário, o *primer* específico RCR2 foi utilizado com o mesmo *primer* arbitrário utilizado nas reações anteriores. A solução de reação para o PCR terciário foi a mesma que para o PCR primário, exceto que 1 µL da diluição de 50 vezes do produto de PCR secundário foi usado como molde, e a concentração do *primer* arbitrário foi de 500 nM em vez de 2 µM. As reações foram realizadas como descrito por Liu *et al.* (1995), exceto que a temperatura para o ciclo de anelamento foi definida como 29 °C, em vez de 44 °C. Os produtos de PCR foram separados em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio e visualizados com luz UV. Os produtos do PCR terciário foram purificados utilizando o *Kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega) e os fragmentos foram clonados no vetor pGEMT Easy (Promega) e posteriormente sequenciados na Macrogen Inc (Coreia).

RACE-PCR

Para obter a sequência completa de cDNA do *RcDREB1*, foram realizadas amplificações das extremidades 5' e 3' de cDNA por RACE-PCR a partir de RNA isolado de folhas de mamona. Os *primers* gene específicos foram construídos a partir do fragmento interno sequenciado e o cDNA foi amplificado utilizando o sistema de 5' e 3' RACE (Invitrogen), utilizando o *nested primer* específico reverso DREBRcRACER (5'-AAGCCTTGACAGACGGGCCTC-3') em combinação com o GeneRacer 5'-*Primer* (Invitrogen), e o *primer* específico DREBRcRACEF (5'-CGGCCGCTCGAGCCTATGAC-3'), em combinação com GeneRacer Oligo dT (Invitrogen). Os produtos obtidos via PCR foram clonados no vetor pGEMT Easy (Invitrogen) e sequenciados.

Análises filogenéticas

Todas as pesquisas de similaridade foram executadas localmente usando o BlastN, BlastX, ou BlastP, que são ferramentas encontradas na página do NCBI. A detecção do *motif* foi realizada com a versão MEME 4.7.0 (Bailey *et al.*, 2009). O promotor *RcDREB1* foi selecionado para detectar os elementos *cis* usando o PlantCARE e PLACE/Signal Scan platforms (Higo *et al.*, 1999; Lescot *et al.*, 2002). A relação entre o *RcDREB1* e os fatores de transcrição AP2/ERF foi determinada pelo alinhamento com sequências disponíveis no GenBank

(www.ncbi.nih.nlm.gov) e os índices pelo gene TIGR. Apenas sequências codificantes completas foram utilizadas para análise. O alinhamento foi realizado utilizando o programa CLUSTAL W (Thompson *et al.*, 1994). As análises filogenéticas e moleculares foram realizadas usando a versão MEGA 5 (Tamura *et al.*, 2011). As árvores filogenéticas foram construídas com valores do algoritmo Bootstrap Neighbour-Joining e foram calculados com 1000 repetições para avaliar o apoio para os agrupamentos (Saitou & Nei, 1987).

A sequência da proteína foi analisada *in silico* utilizando o netstart 1.0, 1.1 e TargetP NLStradamus (Pedersen & Nielsen, 1997; Emanuelsson *et al.*, 2007; Nguyen Ba *et al.*, 2009).

Análise de expressão por RT-PCR em mamona

Sementes em desenvolvimento (5, 10, 15, e 20 dias após a polinização), folhas, óvulos, grãos de pólen (a partir de anteras de flores masculinas durante a antese, 1 e 2 dias antes da antese e 2 dias após a antese), caules e sépalas foram removidos a partir de plantas de mamona cultivadas em condições de campo e utilizados para a extração de RNA total usando o kit RNeasy (Qiagen, Valencia, CA, EUA) a partir de 200 mg de tecido fresco de folhas e flores e de embriões imaturos. O DNA genômico residual foi eliminado por digestão com DNase nas amostras de RNA. Uma alíquota de 8 µg de RNA total foi usada para sintetizar o cDNA total usando o kit Superscript III (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). As anteras

estavam parcialmente deiscentes no momento da colheita do pólen no dia da antese. Um dia após a antese elas estavam completamente deiscentes e muito reduzidas em tamanho. As reações de polimerase em cadeia via transcriptase reversa (RT-PCR) foram realizadas num termociclador MJ Investigador (PTC-100, EUA) em 50 µL de solução contendo 40 ng de cDNA, 60 mM Tris-SO₄ (pH 8,9), 18 mM (NH₄)₂SO₄, 2 mM de MgSO₄, 250 nM de cada dNTP, 200 nM de cada iniciador e 5 U de Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen). A mistura foi tratada a 95 °C (5 min) e submetida a 35 ciclos de amplificação (95 °C, durante 1 min, 55 °C, durante 1 min, 68 °C, durante 1 minuto) com um ciclo de alongamento final de 5 minutos a 68 °C. O número de ciclos de amplificação foi previamente otimizado, a fim de interromper a reação na fase exponencial, assegurando que a amplificação fosse semi-quantitativa. Os *primers* RCDREBF (5'-AGAGTCGATGCTCTTGAAACCGCT-3') e RCDREBR (5'-TCCGAATCTTCCGGGTCGGGT-3') foram utilizados para amplificar um fragmento de 227 pb do *RcDREB1*. Como controle interno, os *primers* EF1F (5'-TGTTGCTGTTAAGGATTTGAAGCG-3') e EF1R (5'-AACAGTTTGACGCATGTCCCTAAC-3') foram utilizados para amplificar 358 pb dentro do gene de mamona, *RcEFa*, e o EF-1a foi utilizado como fator de alongamento. Os fragmentos do *RcDREB1* amplificados a partir de pólen foram clonados no pGEMT Easy e sequenciados.

Construção do vetor contendo o promotor *RcDREB1*

A região -5' do gene *RcDREB1*, de 859-pb, foi clonado a *upstream* da região de codificação do *uidA* (*gus*) para criar uma fusão de promotor-*gus*. O par de *primers* RcDPNcoR (5'-TCCATGGATGGAGACAAATAATCACTC-3') e RcDPKpn (5'-CGGTACCCCTTAGGACTATACACCTC-3'), incluindo os sítios de *Nco* I e *Kpn* I (sublinhados) foram utilizados para amplificar a região flanqueadora 5' do *RcDREB1* por PCR. A reação foi realizada como descrito anteriormente, utilizando 5 U de Taq Platinum DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen). O fragmento amplificado foi clonado no vetor pGEMT Easy (Promega) e novamente sequenciados. A região 5' do gene foi retirada de *RcDREB1* pGEMT Easy com *Eco* RI/*Nco* I e inserida no vetor pCambia 3201 (CAMBIA, Camberra Austrália), substituindo o promotor CaMV 35S, gerando o plasmídeo *pRcDREBGUS*.

Transformação genética de plantas de tabaco

O vetor *pRcDREBGUS* foi transferido para a linhagem de *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404, a qual foi utilizada para transformar tabaco como descrito por Horsch *et al.* (1985). A linhagem de *Agrobacterium* contendo o vetor *pRcDREBGUS* foi inicialmente diluída em 10 mL de meio LB (Miller, 1972) contendo os antibióticos 100 mg/L rifampicina, 50 mg/L estreptomicina e 25 mg/L de cloranfenicol. A cultura cresceu por 16 h a 28° C sob a agitação de 100 rpm até a fase exponencial de crescimento ($A_{600nm}=1,5$). Após a obtenção da cultura

bacteriana iniciou-se o corte das folhas jovens de *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi, cultivadas em meio de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962).

Cortou-se as folhas em quadrados de 1 cm² com auxílio de uma lâmina de bisturi estéril, sobre uma placa de Petri umedecida com água deionizada estéril para mantê-los hidratados. Os explantes foliares foram adicionados à co-cultura líquida em temperatura ambiente por 10 min e com leve agitação, depois transferidos para uma placa de Petri com papel de filtro estéril com a finalidade de retirar o excesso de meio contendo as bactérias. Em seguida foram colocados em meio MS sólido contendo 10 mg/L de BAP (6- benzilaminopurina) por 48 horas a 28°C, em ambiente escuro, mantendo a face adaxial em contato com o meio.

Ao término da co-cultura sólida, os explantes foram transferidos para meio de regeneração MS contendo 2 mg/L de BAP, 300 mg/L de timentin e 10 mg/L do agente seletivo herbicida glufosinato de amônio (GA). As placas foram mantidas em câmara de crescimento sob fotoperíodo de 16 h à temperatura de 27 ± 2°C. Os explantes foram cultivados por duas semanas e os calos obtidos foram separados e transferidos para novo meio de regeneração com o agente seletivo específico. Os brotos transformados e regenerados foram transferidos para o meio de enraizamento (meio MS contendo 0,1 mg/L de ANA com o agente seletivo GA).

As plantas transgênicas foram testadas para detecção da presença de fosfinotricina acetiltransferase com o Teste Kit Trait LL (Strategic Diagnostic Inc.). As plântulas transgênicas regeneradas foram aclimatadas em casa de vegetação até a produção e colheita das sementes.

Tratamentos por estresse abiótico

Três linhagens de tabaco transgênico (T_0) e de não transgênico foram submetidos a várias condições abióticas de acordo com Gutha & Reddy (2008), com modificações. Foram realizados testes em solo, sob hidroponia e em condições de estresse *in vitro*. Alguns tecidos como raiz, folhas e caule foram coletados e testados para verificar a expressão de GUS.

Para os experimentos realizados em condições de solo, as plantas ($n = 12$) com 40 dias de idade foram submetidas à seca, a alta salinidade, e também a baixa e alta temperatura. Para tratamento de déficit hídrico, a rega foi retida por 15 dias e as amostras foram coletadas diariamente. Para os tratamentos de alta salinidade, as plantas foram irrigadas com 100 mL de uma solução contendo 600 mM de NaCl, durante sete dias e as amostras foram retiradas diariamente. No tratamento de baixa temperatura, as plantas foram incubadas a 10 °C, 75% UR, fotoperíodo de 16h, por um período de dois dias e amostras foram coletadas diariamente. Para o tratamento de alta temperatura, as plantas foram incubadas a 45 °C, 15% UR, 16h de fotoperíodo, durante sete dias e as amostras foram coletadas em 0, 2, 6 e 24 h no primeiro dia, seguido de coletas de amostras a cada 24h durante seis dias.

Em condições de hidroponia, as plantas ($n = 6$) com oito dias de idade foram cultivadas sob fotoperíodo de 16h e submetidas a tratamentos de salinidade e ABA. Para o tratamento estresse salino, as plantas foram cultivadas em contato com solução aquosa contendo 250 mM de NaCl por cinco dias. No tratamento

hormonal, as plantas foram cultivadas na presença de 200 μ M de ABA durante sete dias. As amostras foram coletadas a cada hora para as primeiras 6h e a cada 24h, por cinco dias para o estresse salino e durante sete dias para as plantas em contato com o ABA.

Nos experimentos realizados em condições *in vitro*, plântulas (n = 10) com sete dias de idade foram cultivadas em placas de Petri (9 cm de diâmetro) contendo meio MS suplementado com 100 μ M de ABA, ou PEG 10%, ou 200 mM de manitol, ou 200 mM de NaCl durante 15 dias (Murashige & Skoog, 1962). As amostras foram coletadas a cada sete dias.

Ensaio histoquímico do gene *gus*

A expressão do gene em todos os órgãos vegetativos e reprodutivos, em diferentes fases de desenvolvimento foi analisada através do ensaio histoquímico do gene *gus* de acordo com Jefferson *et al.* (1986). Os micrósporos/grãos de pólen foram removidos de anteras em oito fases do desenvolvimento floral (a-h) correspondentes para os estágios 1 (= a), 2 (= b), 6 (= c), 8 (= d), 11 (= e) e 12 (= f), como descrito por Koltunow *et al.* (1990). Os estágios g e h correspondem a períodos de senescência da flor.

Quantificação da expressão de GUS em grãos de pólen

A contagem dos grãos de pólen que apresentaram coloração azul após o ensaio histoquímico do gene *gus* foi realizada utilizando-se a câmara de Neubauer (Maêda, 1985).

RESULTADOS

Clonagem de um gene *DREB* de *R. communis*

Por meio de PCR utilizando *primers* degenerados, TAIL-PCR e 5'-e 3'-(RACE)-PCR, foi possível obter uma sequência de 1782 pb do genoma de *R. communis*. A sequência obtida foi depositada no banco de dados do NCBI GenBank com o número de acesso JQ361741. O cDNA contém uma fase de leitura aberta (ORF) de 588 pb codificando 195 aminoácidos com massa molecular prevista de 21,7 kDa (pI 7,08), sendo 1.025 pb correspondentes à região 5' e 169 pb correspondentes à região 3'. A iniciação da tradução foi prevista utilizando o NetStart 1.0 (Pedersen & Nielsen, 1997).

A sequência deduzida de aminoácidos foi utilizada para comparar a composição de aminoácidos do polipeptídeo *RcDREB1* com os TFs AP2/ERF de outros vegetais, e apresentou identidade 38-78% para a sequência de aminoácidos global. Foi previsto que o *RcDREB1* codifica um único domínio AP2/ERF (na posição 26-82), com 94-99% de identidade. Nenhum domínio B3 foi encontrado. A sequência codificante de nucleotídeos da região putativa do gene *RcDREB1* foi comparada com sequências de genes de AP2/ERF encontrados em *Viridiplantae* disponíveis nos bancos de dados do GenBank e TIGR. Os resíduos de aminoácidos, E16, W27, L28, G29 do domínio AP2/ERF *RcDREB1* foram conservados quando comparados com todas as outras 220 proteínas AP2/ERF identificadas nas culturas de soja e *Arabidopsis thaliana*. Além disso, os resíduos

R8 e G29 eram completamente conservados, quando comparados com todas as 139 proteínas AP2/ERF identificadas em arroz (*Oryza sativa*). O algoritmo 1,1 TargetP mostrou que não há trânsito de peptídeos sinal alvo no cloroplasto ou mitocondriais na região N-terminal de *RcDREB1* (Emanuelsson *et al.*, 2007). Já o NLStradamus previu um sinal de localização nuclear putativa (NLS) do domínio (Nguyen Ba *et al.*, 2009).

Os *motifs* conservados fora do domínio *RcDREB1* AP2/ERF foram examinados usando o MEME. Alguns *motifs* conservados identificados em proteínas da família ERF em *Arabidopsis* e *Glycine max* também foram observados nas sequências de aminoácidos do *RcDREB1*. O *motif* ERF-Associated Amphiphilic Repression (EAR) [D (L / M) NxxP] foi encontrado na região C-terminal. No entanto, o tipo de *motif* LxLxL EAR não está presente. A assinatura ERF da proteína (FKGIRMRKWGKW), os *motifs* de iniciação do fator de transcrição - TFIID (SSSNNNNNNSN e SSSSNNNNNNS) e um *motif* PEST potencial (KVPDPEDSDVEWER) também foram encontrados.

A análise de sequência da região 5' do *RcDREB1* não revelou nenhum TATA *box* (TATAWAW; W = A / T) típico. Entretanto, foram encontrados cinco TATA *box* no *RcDREB1*, que anteriormente tinham sido detectados na região 5' do gene da glutamina sintetase de *Pisum sativum* e confirmadas como um elemento TATA por análise *in vivo* (Figura 2) (Tjaden *et al.*, 1995). Além disso, o *erd1* (ACGTG; *Early Response to Dehydration element*) foi encontrado na posição 202 (Simpson *et al.*, 2003). Havia cinco caixas CAAT, que são sequências necessárias para a correta e eficiente transcrição de um gene. Para identificar os elementos

reguladores, a sequência *upstream* 5' foi analisada por meio do banco de dados PlantCARE e PLACE. Foram detectados os *motifs* AGAAA e GTGA, que são dois elementos regulatórios *cis-acting* conhecidos por estarem envolvidos na expressão específica de pólen/antera (Figura 2). Havia três cópias de *motifs* AGAAA (Filichkin *et al.*, 2004) e três cópias de *motifs* GTGA. Tantas cópias de AGAAA e *motifs* GTGA sugerem que este promotor pode ser um promotor específico de pólen/antera (Tabela 1).

```

-863 TAATCCCTTAGGACTATACACCTCACTCTTCCTTTTATTCATTCATTAAACTATTTTAT
-803 AAACAATATCTCTCAGCATAAACAATATCTCCAATTTGATATTGTAATTTATGATAATAG
-743 ATTAAATTTTCATTTTCAAATGCTGAAAATTATTTATTTTCATGTGTATACTATAATGCA
-683 AGAAATAAGTTTTAGAAACCTACAACATTTTATAATTTGTTTATTTATTTTATTAATAAA
-623 TTATAATTTTATTAATTTTAAATATAGCTTTATAATTTGTTTATTTAAATTTATTATATA
-563 GTAATTAATTTATATTTAATATAAAAAAGAATATTTTTATAGTATATATACTTGTTTTAAA
-503 TAAAAATTACTTCAAAAAATATACAAACGAGGAAGGCATTCCTCTCTCTCTCTCTCTCTC
-443 TCTCTCTCTCTCTCCCTCTCTTTCTCTCTCGCCCTATAAGGGAAACAACATAAACACACC
-383 CTTCACTCTCGCACAGACAACAGCACAAAGCCTTTCTTTTTCATTTTCTTTCCCTTTAA
-323 ACAATTTCCACAAAGATTTGTGTGGTGAATTTGGATTTTCTATCTTTATTTCTTTTTTC
-263 CCCTTATCAAACCCCATCTCTTAATATTAAATAAAAAACAAAACCCAAAAATCACAATC
-203 AACGTGTAAGCTTACCTGAATGACACCCCGTTTCTTTTCATACCCAGCTGAGCAGAGCT
-143 CTACCCATGAAAACCCATCTTCTCTAACTAACTCCTTCCTCCATGAAAGCTCGGTAAC
-83 ATCTTCGCTTAGGTTTCTTCAATTTTTTTTTAGTGATACAAAAATAAAAAAGAGAAATT
-23 CGAGTGATTATTTGTCTCCATACATGGAAATGGAAGGCGAAACGGAGAAGGTGATAACAA

```

Figura 2. Sequência de nucleotídeos do promotor *RcDREB1*. A numeração é desde a primeira base do sítio de início da tradução (+1). O TATA putativo, *boxes* CAAT e o ponto de início da tradução ATG em caixas retangulares. Indicação dos elementos *cis* específicos de pólen (AGAAA e GTGA) marcados com fundo cinza e o *erd1* sublinhado.

Tabela 1. Lista de elementos encontrados *in silico* no promotor *RcDREB1*.

Elementos/Características	Sequência	Número de cópias
<i>Box</i> - transcrição eficiente	CAAT	5
TATA box	TTATTT	5
POLLEN2LELATE52 - <i>cis</i> - específico de pólen/antera	AGAAA/ TCCACCATA	3
<i>cis</i> - específico de pólen/antera	GTGA	3
Gene <i>erd1</i> - resposta à desidratação	ACGTG	1
ABRE - resposta à ABA	GACGCGTGTC	1

Análise filogenética

Para classificar e analisar as relações filogenéticas foram realizadas análises de alinhamento múltiplo de sequências de aminoácidos do domínio AP2/ERF comparadas com a proteína *RcDREB1*. Com base no alinhamento foi gerada uma árvore filogenética, a qual divide proteínas AP2/ERF em grupos de acordo com a subfamília (Figura 3). Esta árvore filogenética sugere que o *RcDREB1* pertence à subfamília CBF/DREB. A segunda análise filogenética foi realizada com sequências de proteínas da subfamília CBF/DREB (Figura 4). A árvore filogenética dividiu as proteínas em seis subgrupos, designados de A-1 a A-6, de acordo com a classificação descrita por Sakuma *et al.* (2002). O gene é *RcDREB1* foi agrupado no subgrupo A-5.

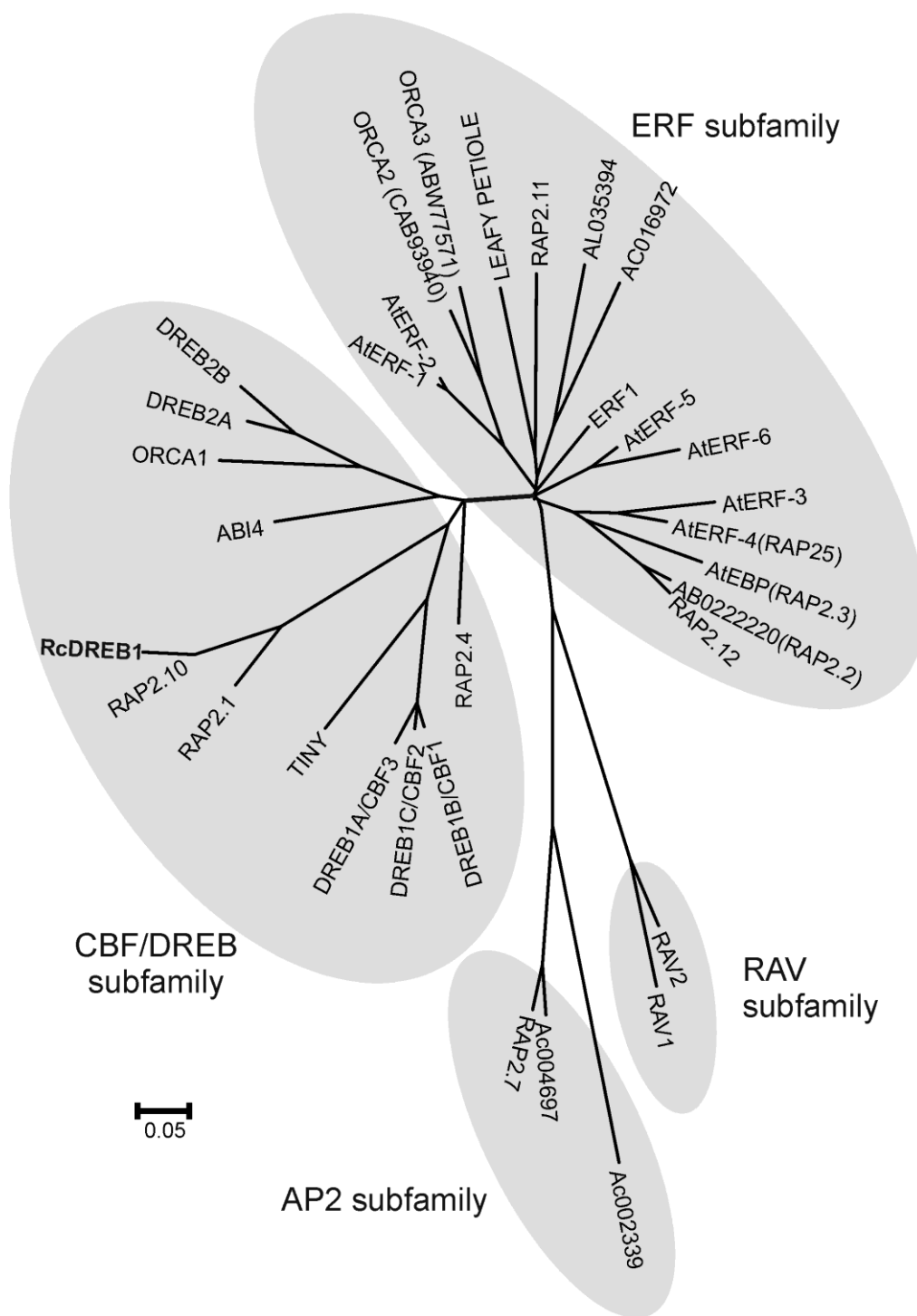


Figura 3. Análise filogenética da proteína RcDREB1 com outras proteínas AP2/ERF. A RcDREB1 foi agrupada na subfamília CBF/DREB. As sequências de aminoácidos dos domínios AP2/ERF foram alinhadas por Clustal W e a árvore filogenética foi construída usando o MEGA 5 com método Neighbor-Joining. A árvore inclui os domínios AP2/ERF disponíveis nos bancos de dados GenBank e TIGR. Os valores de consenso considerados para a árvore foram *cut-off bootstrap* > 50.

Identificação das proteínas, organismos e seus respectivos números de acesso no GenBank utilizados para a construção da árvore filogenética da Figura 3: AtERF-1 (*Arabidopsis thaliana*) AEE76738.1; AtERF-2 (*Arabidopsis thaliana*) AED95487.1; AtERF3 (*Arabidopsis thaliana*) AEE32574.1; AtERF4 (*Arabidopsis thaliana*) O80340.1; AtERF5 (*Arabidopsis thaliana*) AED95489.1; AtERF6 (*Arabidopsis thaliana*) AEE83902.1; ORCA1 (*Catharanthus roseus*) CAB93939; ORCA2 (*Catharanthus roseus*) CAB93940.1; ORCA3 (*Catharanthus roseus*) ABW77571.1; LEAFY PETIOLE (*Arabidopsis thaliana*) AAF32292.1; BAC F9D16 (*Arabidopsis thaliana*) AL035394 ; BAC F23N20 (*Arabidopsis thaliana*) AC016972; RAV1 (*Arabidopsis thaliana*) BAA34250.1; RAV2 (*Arabidopsis thaliana*): BAA34251.1; DREB2A (*Arabidopsis thaliana*) BAA36705.1; DREB2B (*Arabidopsis thaliana*) BAA36706.1; ABI4 (*Arabidopsis thaliana*) AAD25937; RcDREB1 (*Ricinus communis*) AFI08637; RAP2.1 (*Arabidopsis thaliana*) AEE32129; RAP2.2 (*Arabidopsis thaliana*) AEE75492; RAP2.3 (*Arabidopsis thaliana*) AEE75863.1; RAP2.4 (*Arabidopsis thaliana*) AEE36065; RAP2.7 (*Arabidopsis thaliana*) AEC08138.1; RAP2.10 (*Arabidopsis thaliana*) AEE86715; RAP2.11 (*Arabidopsis thaliana*) AED92749.1; RAP2.12 (*Arabidopsis thaliana*) AEE33023.1; TINY (*Arabidopsis thaliana*) AAC29139; DREB1B/ CBF1 (*Arabidopsis thaliana*) AEE85066; DREB1C/CBF2 (*Arabidopsis thaliana*) Q9SYS6; DREB1A/CBF3 (*Arabidopsis thaliana*) AEE85065; (*Arabidopsis thaliana*) AC002339; (*Arabidopsis thaliana*) AC004697.

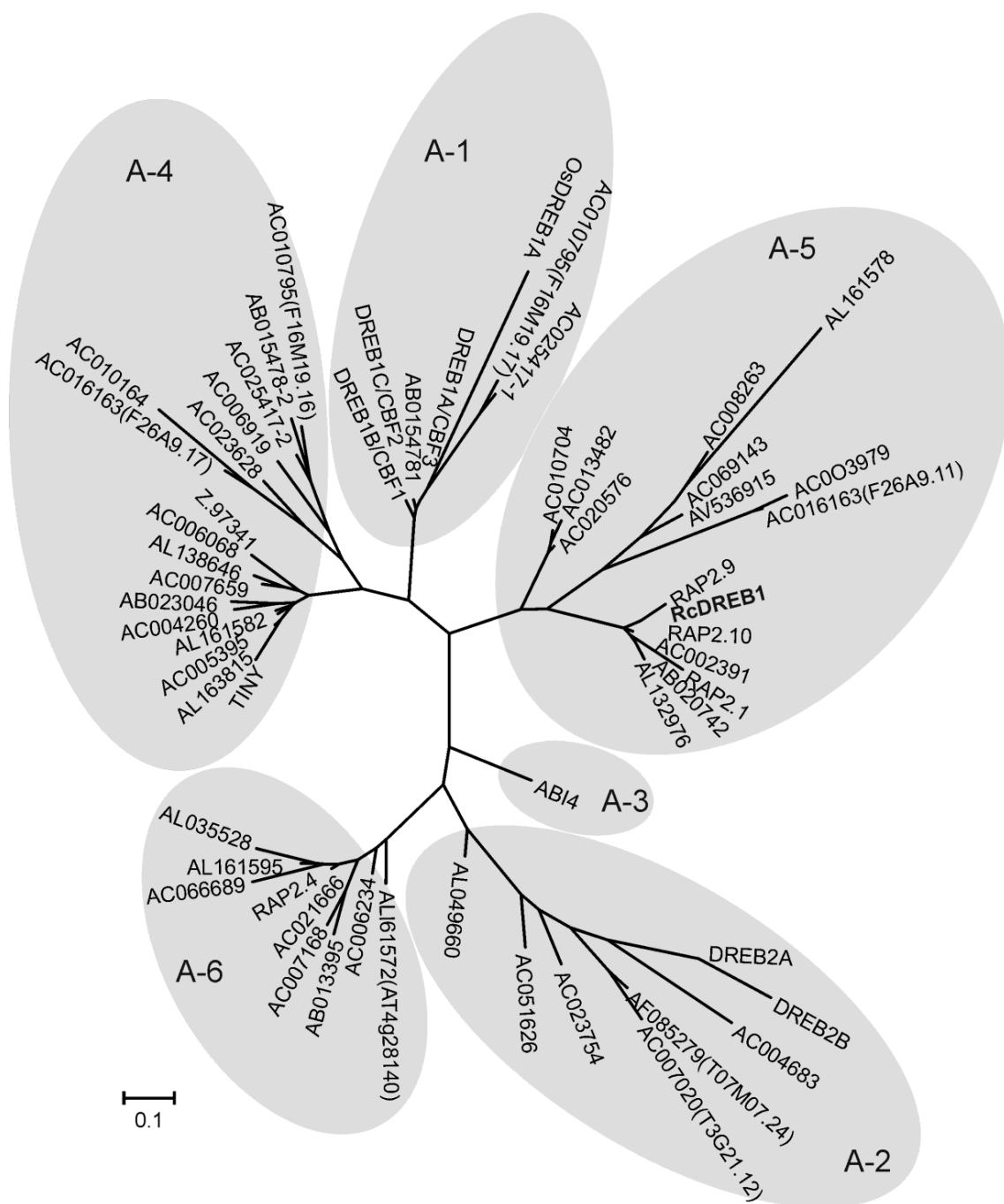


Figura 4. Análise filogenética da proteína RcDREB1 com outras proteínas DREB. A RcDREB1 foi agrupada no subgrupo A-5. As sequências de aminoácidos foram alinhadas por Clustal W e a árvore filogenética foi construída utilizando o MEGA 5 com método Neighbor-Joining. A árvore inclui domínios AP2/ERF disponíveis nos bancos de dados GenBank e TIGR. Os valores de consenso considerados foram *cut-off bootstrap* > 50.

Identificação das proteínas, organismos e seus respectivos números de acesso no GenBank utilizados para a construção da árvore filogenética da Figura 4: TINY (*Arabidopsis thaliana*) AAC29139; DREB1B/ CBF1 (*Arabidopsis thaliana*) AEE85066; DREB1C/CBF2 (*Arabidopsis thaliana*) Q9SYS6; DREB1A/CBF3 (*Arabidopsis thaliana*) AEE85065; ABI4 (*Arabidopsis thaliana*) AAD25937; RcDREB1 (*Ricinus communis*) AFI08637; OsDREB1A (*Oryza sativa*) AEW67332; T12C24 (*Arabidopsis thaliana*) AC025417.1; T5M16 (*Arabidopsis thaliana*) AC010704; BAC T26F17 (*Arabidopsis thaliana*) AC013482; BAC T12C22 (*Arabidopsis thaliana*) AC0020576; BAC F25A4 (*Arabidopsis thaliana*) AC008263; AL161578 (*Arabidopsis thaliana*) AL161578; BAC T29M8 (*Arabidopsis thaliana*) AC069143; BAC F16M19.17 (*Arabidopsis thaliana*) AC010795; BAC T22J18 (*Arabidopsis thaliana*) AC003979; BAC F26A9 (*Arabidopsis thaliana*) AC016163; T20D16 (*Arabidopsis thaliana*) AC002391; RAP2.1 (*Arabidopsis thaliana*) AEE32129; RAP2.4 (*Arabidopsis thaliana*) AEE36065; RAP2.9 (*Arabidopsis thaliana*) AEE82561; RAP2.10 (*Arabidopsis thaliana*) AEE86715; TAC K21H1 (*Arabidopsis thaliana*) AB020742; DREB2A (*Arabidopsis thaliana*) BAA36705.1; DREB2B (*Arabidopsis thaliana*) BAA36706.1; T19C21 (*Arabidopsis thaliana*) AC004683; T07M07.24 (*Arabidopsis thaliana*) AF085279; T3G21.12 (*Arabidopsis thaliana*) AC007020; F20L16 (*Arabidopsis thaliana*) AC051626; F5H14 (*Arabidopsis thaliana*) AC006234; MQN23 (*Arabidopsis thaliana*) AB013395; T26C19 (*Arabidopsis thaliana*) AC007168; BAC T22A15 (*Arabidopsis thaliana*) AC021666; BAC F11C1 (*Arabidopsis thaliana*) AL132976; BAC F15B8 (*Arabidopsis thaliana*) AL049660; BAC F1B16 (*Arabidopsis thaliana*) AC023754;

BAC F15H21 (*Arabidopsis thaliana*) AC066689; BAC F18A5 (*Arabidopsis thaliana*) AL035528; BAC F15N18 (*Arabidopsis thaliana*) AL163815; BAC T14N5 (*Arabidopsis thaliana*) AC004260; BAC F16M19 (*Arabidopsis thaliana*) AC010795; BAC T8B10 (*Arabidopsis thaliana*) AL138646; BAC T14N5 (*Arabidopsis thaliana*) AC004260; BAC F26A9 (*Arabidopsis thaliana*) AC016163; BAC F14M2 (*Arabidopsis thaliana*) AC010164; BAC F6F3 (*Arabidopsis thaliana*) AC023628; MYA6 (*Arabidopsis thaliana*) AB023046; T13E15/T14P1 (*Arabidopsis thaliana*) AC007659; F17H15 (*Arabidopsis thaliana*) AC005395; T20F21(*Arabidopsis thaliana*) AC006068; ESSA1FCA (*Arabidopsis thaliana*) Z97341; F1O11 (*Arabidopsis thaliana*) AC006919; T12C24.2 (*Arabidopsis thaliana*) AC025417-2; (*Arabidopsis thaliana*) AV536915; (*Arabidopsis thaliana*) AL161572; (*Arabidopsis thaliana*) AL161595; (*Arabidopsis thaliana*) AL161582; (*Arabidopsis thaliana*) AB015478-2.

Nível de transcritos *RcDREB1* em órgãos de *R. communis*

As análises de expressão por RT-PCR foram realizadas para detectar transcritos endógenos do *RcDREB1* em diferentes órgãos de *R. communis* e em sementes em desenvolvimento. Os resultados revelaram a ausência de transcritos do gene *RcDREB1* nas sementes em desenvolvimento, folhas, óvulos, caules e nas flores de plantas cultivadas em condições de campo (dados não mostrados). Os transcritos do *RcDREB1* foram observados nos grãos de pólen, com um pico durante a antese (Figura 5). No entanto, não é possível concluir definitivamente que apenas o *RcDREB1* é expresso, porque outros genes DREB estão presentes

no genoma de mamona e estes genes possuem uma grande similaridade de sequência.

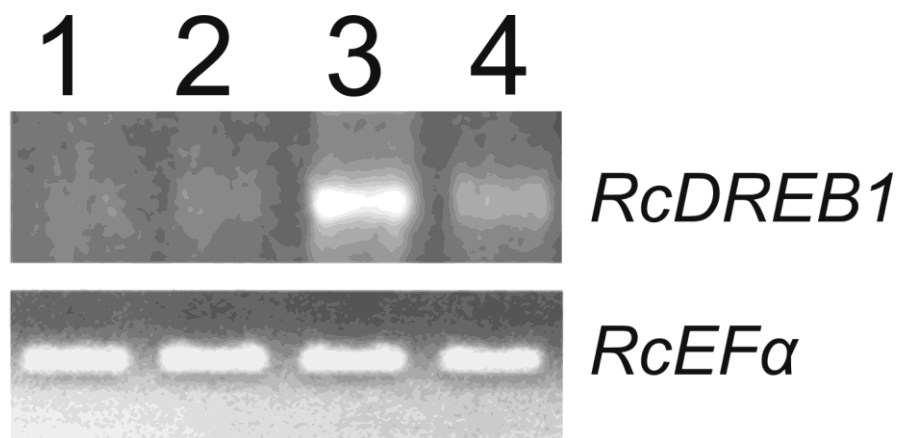


Figura 5. Expressão do gene *RcDREB1* em grãos de pólen de flores masculinas de mamona. (1, 2) Um e dois dias antes da antese. (3) Durante a antese. (4) Dois dias após a antese. As bandas superiores amplificadas coincidem com o fragmento esperado do gene *RcDREB1* e as bandas inferiores correspondem à transcrição do gene *RcEFα* (fator de alongamento EF-1 α ; controle interno).

Expressão do gene *gus* sob o controle do promotor *RcDREB1*

Para determinar se o promotor *RcDREB1* seria funcional sob condições de estresse, a região 3' do promotor fusionou-se com a sequência de codificação do gene repórter *gus*, gerando o vetor *pRcDREBGUS* (Figura 6). Esse vetor foi utilizado para transformação de plantas de tabaco por *Agrobacterium* e os explantes permaneceram *in vitro* até a regeneração e enraizamento das plântulas (Figura 7).

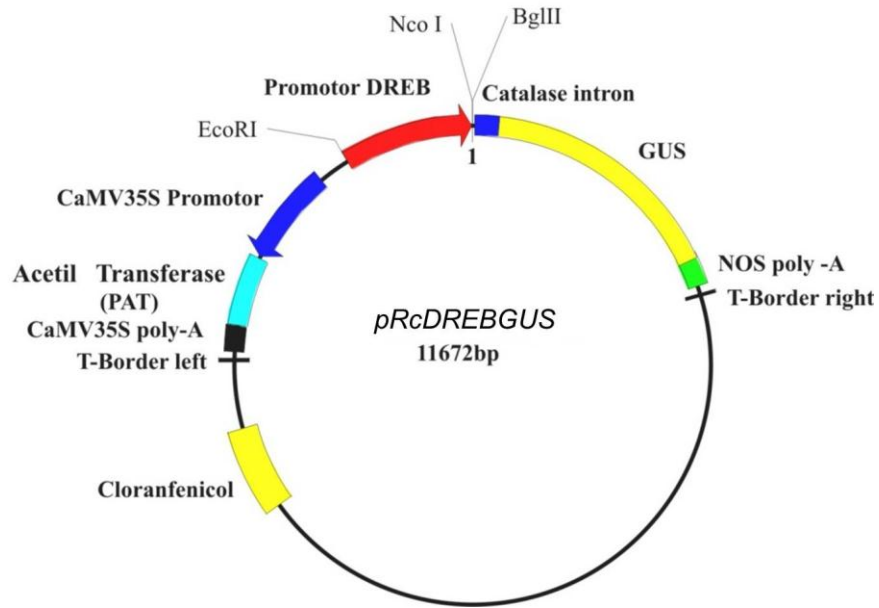


Figura 6. Desenho do vetor *pRcDREBGUS* utilizado para a transformação genética de tabaco. O promotor *RcDREB1*, em vermelho, controlando o gene *gus*, em amarelo. O vetor possui o gene *bar* que codifica para a proteína fosfotricina acetiltransferase.

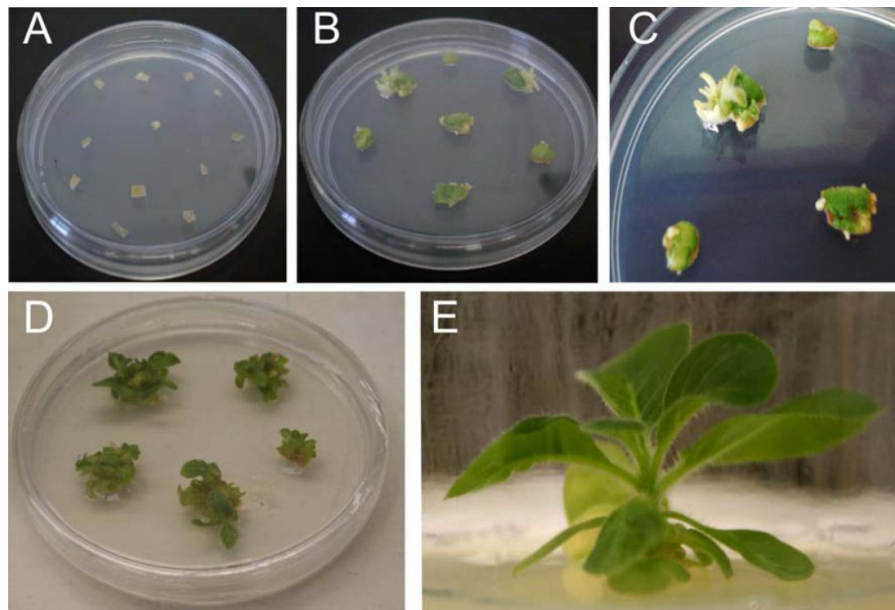


Figura 7. Desenvolvimento de explantes foliares de tabaco após a transformação por *Agrobacterium*. (a) Explantes após a co-cultura. (b), (c) e (d) Regeneração de brotos na presença do agente seletivo GA. (e) Plântula de fumo em meio de enraizamento três meses posterior à transformação genética.

O vetor construído para transformar as plantas de tabaco possui o gene marcador de seleção *bar* que codifica para a proteína fosfinotricina acetiltransferase (PAT), que por sua vez, inativa o herbicida fosfinotricina (PPT) ou o análogo glufosinato de amônio. A identificação da integração do gene *bar* nas plantas regeneradas deu-se pela análise com o Kit Trait LL, que a partir de anticorpos específicos, detectou a presença da proteína PAT no extrato vegetal das plantas de tabaco regeneradas. Essa presença foi confirmada com o aparecimento da linha inferior na tira (Figura 8).

Quinze linhagens de tabaco transgênico foram obtidas pela transformação dos explantes com o vetor contendo o promotor *RcDREB1*. Sendo que destas, três linhagens foram utilizadas para experimentos posteriores.

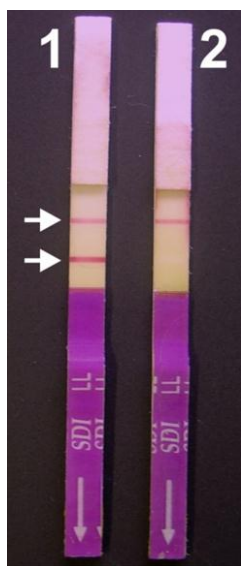


Figura 8. Teste realizado com extrato de folhas de tabaco para detecção da proteína PAT. (1) Teste com uma planta transgênica, o aparecimento da linha inferior demonstra a presença da proteína PAT. (2) Controle negativo realizado com folha de tabaco não transformada, apenas a linha do controle negativo foi observada.

As plantas não transgênicas e transgênicas cultivadas em solo, sob hidroponia e em condições *in vitro*, foram expostas a vários tratamentos de estresses abióticos (baixa e alta temperatura, seca, salinidade e ABA exógeno). A expressão do gene repórter *gus* foi examinada em vários tecidos das linhagens transgênicas. Amostras aleatórias de folhas, caules e raízes das plantas T1 não apresentaram visível coloração histoquímica de GUS, sugerindo que o promotor *RcDREB1* não está ativo nas condições de estresse testadas.

As plantas transgênicas, não testadas para tratamentos de estresse, desenvolveram-se em condições de casa de vegetação, com fotoperíodo de 16h, com regime normal de irrigação e foram analisadas quanto à expressão do gene *gus*. Nenhuma expressão foi detectada em folhas, caules, raízes, sépalas e ovários. Mais tarde, a expressão foi avaliada durante o desenvolvimento do micrósporo/pólen. Foi possível detectar intensos níveis de expressão do gene *gus* direcionados pelo promotor *RcDREB1* em determinadas fases do desenvolvimento do pólen (Figura 9).

A frequência de coloração azul no pólen foi maior nas fases f e g (99 e 97%, respectivamente), nas quais as flores estão abertas e as anteras deiscentes, liberando os grãos de pólen (Fig. 9f e g). Nas fases c, d, e, foi possível visualizar uma frequência de 6, 11 e 19% (respectivamente) de grãos de pólen que expressam o gene *gus* (Fig. 9c-e). Nessas etapas (c-e), a expressão de GUS foi observada apenas nos grãos de pólen dessecados. Isso coincide com o pico de expressão também verificado por RT-PCR (Fig. 5) em mamona durante a antese nas anteras, o que corrobora o resultado de que expressão é pólen específica. Na

etapa h as flores iniciam a senescência e a expressão do gene *gus* foi observada em cerca de 50% dos pólenes que apresentavam desidratação. Essa frequência de coloração azul, referente à expressão do gene *gus* em função das fases de desenvolvimento da flor de tabaco pode ser verificada na Figura 10, com início da expressão de GUS na fase c e pico na antese, fase f. Nenhuma expressão do gene *gus* foi detectada no pólen de plantas não transgênicas de tabaco. Em todos os testes, a linhagem controle positivo transformada com o promotor CaMV 35S controlando a expressão do gene *gus* mostrou coloração azul intensa (dados não mostrados).

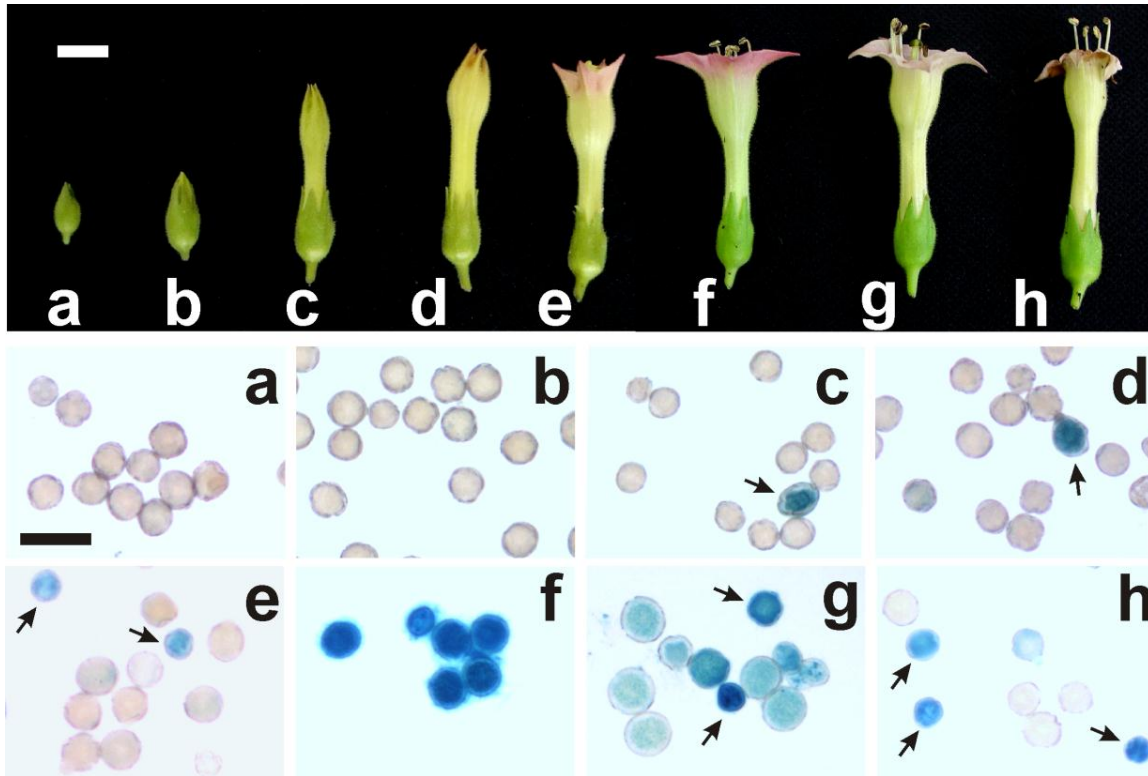


Figura 9. Estágio de desenvolvimento da flor/micrósporo/pólen de tabaco e expressão do gene *gus* sob controle do promotor *RcDREB1*. (a) Anteras e os pistilos totalmente diferenciados (b) Cálice ligeiramente aberto na parte superior do botão. (c) Cálice aberto e corola. (d) Corola alongada com pétalas verdes e ligeiramente aberta. (e) corola semiaberta e anteras e estigmas visíveis. (f) Flor completamente aberta, anteras deiscentes e corola expandida com cor rosa intenso, sendo o momento de maior expressão de GUS. (g, h) Flor em senescência. As setas indicam os grãos de pólen desidratados de c até h. A barra branca no painel superior corresponde a 1 cm (escala para as flores). A barra preta corresponde a 50 μm (escala para grãos de pólen).

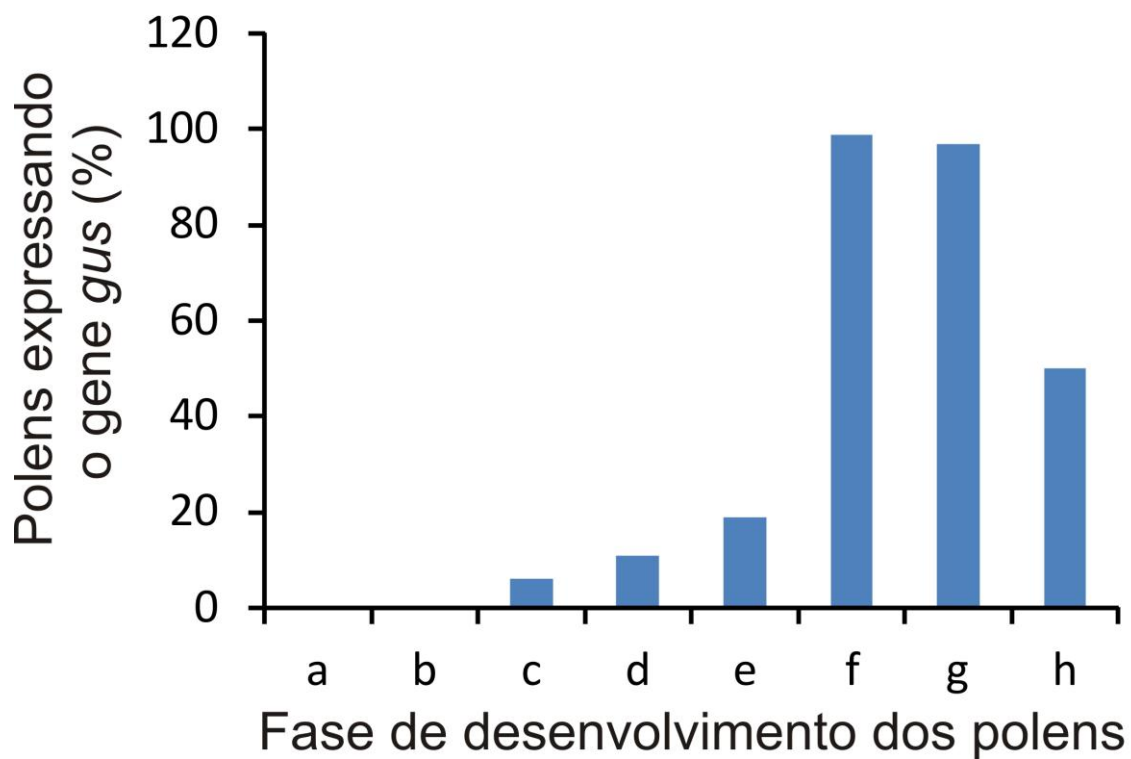


Figura 10. Frequência de coloração azul em grãos de pólen, referentes à expressão do gene *gus* em relação aos estágios, a, b, c, d, e, f, g e h do desenvolvimento floral em tabaco. O pico de coloração azul encontra-se no estágio f que corresponde à antese floral e início do decréscimo a partir da fase g, correspondente à senescência.

DISCUSSÃO

Neste estudo, o primeiro membro da família de fatores de transcrição AP2/ERF, chamado de *RcDREB1* foi caracterizado em mamona, uma espécie tropical perene que apresenta natural tolerância à seca, a solos de baixa fertilidade e altas temperaturas. As plantas têm mecanismos bioquímicos para tolerar o estresse e responder a estas condições, com uma variedade de alterações bioquímicas e fisiológicas, que envolvem a expressão de muitos genes que promovem a capacidade da planta de sobreviver a estes estímulos. Um número significativo de alterações foi mostrado sob o controle do fator de transcrição DREB (Zhou *et al.*, 2010; Lata & Prasad, 2011). Estes fatores de transcrição ativam e/ou regulam a expressão de um grande número de genes, que desempenham importantes papéis na tolerância ao estresse ambiental. Muitas espécies vegetais, especialmente as de origem tropical, têm que responder e se adaptar aos estresses em níveis fisiológicos e bioquímicos de uma forma rápida e plástica, devido às grandes variações de temperatura e umidade neste tipo de clima. No entanto, o gene *DREB* isolado de mamona não apresentou expressão nos diferentes tecidos avaliados. A expressão *RcDREB1* só foi observada em células de pólen com picos máximos durante a antese. Esse mesmo resultado foi verificado nos transcritos de grãos de pólen retirados de plantas de mamona e avaliados por RT-PCR, o que fortalece a confirmação de que esse é um promotor específico de grãos de pólen.

De acordo com Sakuma *et al.* (2002), as subfamílias CBF/DREB e ERF diferem por dois resíduos de aminoácidos conservados no domínio AP2/ERF. Na proteína AtDREB, uma valina e um ácido glutâmico são conservados nas posições 14 e 19, respectivamente, enquanto que em proteínas ERF, os resíduos de alanina e de ácido aspártico são conservados nestas posições. De acordo com outras proteínas da subfamília CBF/DREB, *RcDREB1* tem os resíduos de aminoácidos V₁₄ e E₁₉ no domínio AP2/ERF, sugerindo que é um membro da subfamília CBF/DREB. Além disso, as análises filogenéticas revelaram que o *RcDREB1* foi agrupado na subfamília DREB.

A análise filogenética adicional posicionou o gene *RcDREB1* no subgrupo A-5 da subfamília CBF/DREB, de acordo com a classificação proposta por Sakuma *et al.* (2002). Algumas proteínas DREB pertencentes ao subgrupo A-5 foram caracterizadas como induzidas por estresse, uma vez que são responsivas à presença de ABA (Kizis & Pages, 2002; Wei *et al.*, 2005; Huang & Liu, 2006; Chen *et al.*, 2007).

Das mais de 140 proteínas do domínio AP2/ERF previstas para serem codificadas por *Arabidopsis*, *Brassica napus*, trigo, centeio, tomate, apenas nas CBFs foram encontradas as assinaturas circundantes ao domínio AP2/ERF, sendo a *upstream* (PKK/RPAGRxKfXETRHP) e *downstream* (DSAWR). Os domínios PK (K/R)PAGRxKfXETRHP e DSAWR não foram detectados no *RcDREB1*, corroborando a sugestão de que não é uma proteína CBF. Além disso, estas assinaturas não estão presentes na proteína AtDREB2a (AP2/ERF) de *Arabidopsis* (Liu *et al.*, 1998; Jaglo *et al.*, 2001).

O *motif* ERF/*Associated Amphiphilic Repression* (EAR) está presente no *RcDREB1*. Zhang *et al.* (2008), demonstraram as sequências do *motif* conservado EAR na região C-terminal do subgrupo A-5 nas proteínas da subfamília CBF/DREB em soja e *Arabidopsis*.

Os *motifs* conservados fora do domínio *RcDREB1* AP2/ERF foram examinados usando MEME. Alguns *motifs* conservados nas proteínas da família ERF identificados em *Arabidopsis* e *Glycine max* foram também observados nas sequências de aminoácidos deduzidas de *RcDREB1*. O *motif* ERF/EAR [D (L / M) NxxP] foi encontrado na região C-terminal, mas não o tipo de *motif* LxLxL EAR. A assinatura da proteína ERF (FKGIRMRKWGKW), os *motifs* de iniciação do fator de transcrição TFIID (SSSNNNNNNNSN e SSSSNNNNNNNS) e um *motif* PEST potencial com 12 aminoácidos (KVPDPEDSDVEWER) também foram encontrados. O EAR é um *motif* de transcrição identificado em membros da ERF, C2H2, e nas famílias de reguladores de transcrição de ácido *auxin/indole-3-acetic*. O *motif* EAR de *Arabidopsis*, contendo proteínas descritas na literatura é dividido em dois grupos, com base no padrão de conservação da sequência no *motif* EAR (Kagale *et al.*, 2010). O *motif* DLNxxP é conservado em alguns membros da classe II ERFs, do tipo TFIIA ZFP e proteínas da família ABI3/VP1, enquanto que o *motif* LxLxL é conservado em AUX/laaS e alguns membros da MYB e proteínas da família HD-Zip. A assinatura da proteína ERF e os *motifs* do fator de iniciação da transcrição TFIID também foram encontrados.

Neste estudo, as linhagens transgênicas de tabaco foram geradas para expressar o gene repórter *gus* sob o controle do promotor *RcDREB1*. Embora um

único elemento de resposta ABA (*ABA-Responsive Element* - ABRE) tenha sido identificado no 5' *RcDREB*, a fusão 5' *RcDREB1::gus* não foi funcional em tratamentos com ABA em condições *in vitro* ou em condições hidropônicas. Um elemento adicional é geralmente necessário para alto nível de indução por ABA, tais como CE1 (*Coupling Element 1*), cuja sequência é CCACC (Shen *et al.*, 2004) e CE3 (*Coupling Element 3*), GCGTGTC (Shen *et al.*, 1996), que não foram encontrados no 5' *RcDREB1*. Tem sido demonstrado que a presença do ABRE é necessária, mas não é suficiente, para a expressão do gene induzido por ABA (Shen *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2011). Duas sequências ABRE são necessárias para a expressão do *RD29B* de *Arabidopsis* em sementes e para a expressão de *RD29B* ABA-responsivo no tecido vegetativo (Uno *et al.*, 2000).

O padrão de expressão do *RcDREB1* é muito diferente dos padrões de outras proteínas DREB pertencentes ao subgrupo A-5. A caracterização do gene *DREB* de *Physcomitrella patens* (*PpDBF1*) revelou acúmulo de transcritos sob vários estresses abióticos [déficit hídrico, alta salinidade (NaCl), baixa temperatura] e tratamentos com o hormônio vegetal ABA (Liu *et al.*, 2007). Além disso, as plantas transgênicas de tabaco superexpressando o *PpDBF1* tiveram uma maior tolerância à seca, a salinidade e a estresse por baixas temperaturas. Os trabalhos anteriores sugeriram que existem diferentes mecanismos de regulação entre os três *AtCBF/DREB* genes. Por exemplo, o gene *ICE1* que codifica uma proteína tipo-MYC bHLH foi identificado como sendo um regulador de expressão do gene *AtCBF3/AtDREB1A* mas não de outros genes *AtCBF/AtDREB1* (Chinnusamy *et al.*, 2003).

A senescência da flor está associada com o aumento da produção de etileno (Borochoy & Woodson, 1989). A expressão do gene *RcDREB1::gus* somente foi observada em grãos de pólen, que começam a aparecer quando a flor se abre e no início do processo de senescência, após a dessecação dos grãos de pólen maduros, os quais são liberados das anteras sobre a superfície do estigma que está coberto com exsudatos pegajosos e prontos para a fecundação. A análise *in silico* do promotor *RcDREB1* revelou a presença de três cópias do elemento tardio regulador específico do pólen (*Late Pollen-Specific Element - POLLEN1LELAT52*; AGAAA) responsável pela expressão do gene específico do pólen em tabaco, tomate e trigo (Tebbutt & Lonsdale, 1995; Bate & Twell, 1998; Rogers *et al.*, 2001; Filichkin *et al.*, 2004, Chen *et al.*, 2010). O gene de tomate *lat52* codifica uma proteína rica em cisteína, preferencialmente transcrita na célula vegetativa, durante a maturação do pólen. Análises da organização e do papel dos elementos *cis* reguladores no controle da expressão no desenvolvimento preciso e tecido específico do *lat52* durante o desenvolvimento do pólen revelaram que os elementos *cis* reguladores são necessários para a transcrição pólen específicos e foram localizados dentro da região *upstream* 492-52. Três ativadores independentes dos domínios foram identificados, cada um suficiente para ativar no mínimo o promotor CaMV 35S de um modo pólen específico (Bate & Twell, 1998). Do mesmo modo, uma construção da sequência de codificação do *gus* controlada pelo promotor *LeMAN5*, que contém quatro cópias do POLLEN1LELAT52, foi usada para transformar *Arabidopsis*. A atividade de GUS não foi detectada em raízes, caules, folhas e vagens, mas intensa coloração azul foi observada em

anteras e grãos de pólen em desenvolvimento e nas flores abertas nas plantas transformadas (Filichkin *et al.*, 2004).

CONCLUSÃO

De acordo com os nossos resultados, o gene *RcDREB1* codifica para um fator de transcrição DREB que não é ativado por vários estresses ambientais e nem pela presença de ABA em folhas, caules ou raízes. De maneira interessante, dentre os testes que foram realizados, observamos que o promotor *RcDREB1* foi funcional apenas em grãos de pólen desidratados ou no momento que grãos de pólen maduros desidratados estavam prontos para ser liberados das anteras sendo expostos ao ambiente externo. Isso foi comprovado tanto nos grãos de pólen de mamona em condições de campo, quanto nos pólenes das plantas transgênicas de tabaco. Este é o primeiro relato sobre a caracterização dos fatores de transcrição DREB isolados de mamona e funcional especificamente em grãos de pólen.

PERSPECTIVAS

Tem-se demonstrado que o aumento moderado da temperatura poderia influenciar fortemente o desenvolvimento do pólen (Snider *et al.*, 2011). Os resultados do presente estudo podem ser a base para o desenvolvimento de culturas com pólenes altamente tolerantes ao estresse, o que poderia ter impacto na produtividade em um cenário de aumento da temperatura ou de mudanças climáticas globais. Uma possibilidade para uso dos promotores específicos de pólen é no estudo da viabilidade dos grãos no período que vai desde a dispersão das anteras até o processo de fecundação. Além disso, o uso de promotores pólen-específicos pode ser uma ferramenta para expressar genes alvo de interesse biotecnológico em grãos de pólen. Como outro potencial de aplicação, plantas transformadas com grãos de pólen de longa vida também poderão ser produzidas e em consequência pode ocorrer o aumento da polinização e também da produtividade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abreu EFM, Aragão FJL. Isolation and characterization of a myo-inositol-1-phosphate synthase gene from yellow passion fruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) expressed during seed development and environmental stress. *Ann Bot* 2007;99:285-292.

Agarwal PK, Agarwal P, Reddy MK, Sopory SK. Role of DREB transcription factors in abiotic and biotic stress tolerance in plants. *Plant Cell Rep* 2006;25:1263-1274.

Bailey TL, Bodén M, Buske FA, *et al.* MEME SUITE: tools for motif discovery and searching. *Nucl Acids Res* 2009;37:W202-W208.

Bate N, Twell D. Functional architecture of a late pollen promoter: Pollen-specific transcription is developmentally regulated by multiple stage-specific and co-dependent activator elements. *Plant Mol Biol* 1998;37:859-869.

Beltrão NEM. Crescimento e desenvolvimento da mamoneira (*Ricinus communis* L.). Campina Grande: Embrapa Algodão 2002;1-4.

Beltrão NEM, Lima RLS. Aplicação do óleo de mamona como fonte de energia: biodiesel. In: Azevedo DMP, Beltrão NEM. O agronegócio da mamoneira no Brasil. Campina Grande: Embrapa Algodão 2007;397-416.

Borochoy A, Woodson WR. Physiology and biochemistry of flower petal senescence. Hort Rev 1989;11:15-43.

Boutilier K, Offringa R, Sharma V K, *et al.* Ectopic expression of BABY BOOM triggers a conversion from vegetative to embryonic growth. Plant Cell 2002;14:1737-1749.

Bray E. Molecular responses to water deficit. Plant Physiol 1993;103:1035-1040.

Bruce TJA, Mattes MC, Napier JA, Pickett JA. Stressful “memories” of plants: evidence and possible mechanisms. Plant Sci 2007;173:603-608.

Chen L, Tu Z, Hussain J, *et al.* Isolation and heterologous transformation analysis of a pollen-specific promoter from wheat (*Triticum aestivum* L.). Mol Biol Rep 2010;37:737-744.

Chen M, Wang QY, Cheng XG, *et al.* *GmDREB2*, a soybean DRE-binding transcription factor, conferred drought and high-salt tolerance in transgenic plants. Biochem Biophys Res Commun 2007;353:299-305.

Chierice GO, Claro Neto S. Aplicação industrial do óleo. In: Azevedo DMP, Lima EF. O agronegócio da mamona no Brasil. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica 2001; 89-119.

Chinnusamy V, Ohta M, Kanrar S, *et al.* ICE1: a regulator of cold-induced transcriptome and freezing tolerance in *Arabidopsis*. *Genes Dev* 2003;17:1043-1054.

Chuck G, Meeley R, Hake S. The control of maize spikelet meristem fate by the APETALA2-like gene indeterminate spikelet1. *Genes Dev* 1998;12:1145-1154.

Cortés AJ, This D, Chavarro C, *et al.* Nucleotide diversity patterns at the drought-related DREB2 encoding genes in wild and cultivated common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Theor Appl Genet* 2012;125:1069-1085.

Dinh TT, Girke T, Liu X, *et al.* The floral homeotic protein APETALA2 recognizes and acts through an AT-rich sequence element. *Development* 2012;139:1978-1986.

Dubouzet JG, Sakuma Y, Ito Y, *et al.* *OsDREB* genes in rice, *Oryza sativa* L., encode transcription activators that function in drought-, high-salt- and cold-responsive gene expression. *Plant J* 2003;33:751-763.

Elliott RC, Betzner AS, Huttner E, *et al.* AINTEGUMENTA, an APETALA2-like gene of *Arabidopsis* with pleiotropic roles in ovule development and floral organ growth. *Plant Cell* 1996;8:155-168.

Emanuelsson O, Brunak S, von Heijne G, Nielsen K. Locating proteins in the cell using TargetP, SignalP, and related tools. *Nat Protoc* 2007;2:953-971.

Filichkin SA, Leonard JM, Monteros A, *et al.* A novel endo-betamannanase gene in tomato *LeMAN5* is associated with anther and pollen development. *Plant Physiol* 2004;134:1080-1087.

Gutha LR, Reddy AR. Rice *DREB1B* promoter shows distinct stress-specific responses, and the overexpression of cDNA in tobacco confers improved abiotic and biotic stress tolerance. *Plant Mol Biol* 2008;68:533-555.

Hao D, Ohme-Takagi M, Sarai A. Unique mode of GCC box recognition by the DNA-binding domain of ethylene-responsive element-binding factor (ERF domain) in plants. *J Biol Chem* 1998;273:26857-26861.

Higo K, Ugawa Y, Iwamoto M, Korenaga T. Plant *cis*-acting regulatory DNA elements (PLACE) database. *Nucl Acids Res* 1999;27:297-300.

Horsch RB, Rogers SG, Fraley RT. Transgenic plants. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* 1985;50:433-437.

Huang B, Jin L, Liu JY. Identification and characterization of the novel gene *GhDBP2* encoding a DRE-binding protein from cotton (*Gossypium hirsutum*). J Plant Physiol 2008;165:214-223.

Huang B, Liu JY A. Cotton dehydration responsive element binding protein functions as a transcriptional repressor of DRE mediated gene expression. Biochem Bioph. Res Commun 2006;343:1023-1031.

Jaglo KR, Kleff S, Amundsen KL, *et al.* Components of the *Arabidopsis* c-repeat/dehydration-responsive element binding factor cold-response pathway are conserved in *Brassica napus* and other plant species. Plant Physiol 2001;127:910-917.

Jefferson RA, Burgess SM, Hirsh D. Beta-glucuronidase from *Escherichia coli* as a gene-fusion marker. Proc Natl Acad Sci USA 1986;83:8447-8451.

Jofuku KD, den Boer BG, *et al.* Control of *Arabidopsis* flower and seed development by the homeotic gene *APETALA2*. Plant Cell 1994;6:1211-1225.

Kagaya Y, Ohmiya K, Hattori, T. RAV1, a novel DNA-binding protein, binds to bipartite recognition sequence through two distinct DNA binding domains uniquely found in higher plants. Nucleic Acids Res 1999;27:470-478.

Kagale S, Links MG, Rozwadowski K. Genome-wide analysis of Ethylene responsive element binding factor-associated Amphiphilic Repression (EAR) motif-containing transcriptional regulators in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 2010;152:1109-1134.

Kasuga M, Miura S, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. A combination of the *Arabidopsis DREB1A* gene and stress-inducible *rd29A* promoter improved drought- and low-temperature stress tolerance in tobacco by gene transfer. *Plant Cell Physiol* 2004;45:346–350.

Khan MS. The role of DREB transcription factors in abiotic stress tolerance of plants. *Biotechnol & Biotechnol Eq* 2011; 25:2433-2442.

Kim J-S, Mizoi J, Yoshida T, *et al.* An ABRE promoter sequence is involved in osmotic stress-responsive expression of the *DREB2A* gene, which encodes a transcription factor regulating drought-inducible genes in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol* 2011;52:2136-2146.

Kizis D, Pages M. Maize DRE-binding proteins DBF1 and DBF2 are involved in *rab17* regulation through the drought responsive element in an ABA-dependent pathway. *Plant J* 2002;30:679-689.

Koltunow AM, Truettner J, Cox KH, *et al.* Different temporal and spatial gene expression patterns occur during anther development. *Plant Cell* 1990;2:1201-1224.

Kouri J, Santos RF, Santos JW. Evolução da cultura da mamona no Brasil. In: I Congresso Brasileiro de Mamona. Campina Grande: Embrapa Algodão 2004.

Lata C, Prasad M. Role of DREBs in regulation of abiotic stress responses in plants. *J Exp Bot* 2011; 62:4731-4748.

Lescot M, Déhais P, Thijs G, *et al.* PlantCARE, a database of plant *cis*-acting regulatory elements and a portal to tools for *in silico* analysis of promoter sequences. *Nucl Acids Res* 2002;30:325-327.

Liu N, Zhong N/Q, Wang G-L, *et al.* Cloning and functional characterization of *Ppdbf1* gene encoding a DRE-binding transcription factor from *Physcomitrella patens*. *Planta* 2007;226:827-838.

Liu Q, Kasuga M, Sakuma Y, *et al.* Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought- and low-temperature responsive gene expression, respectively, in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 1998;10:1391-1406.

Liu Y-G, Mitsukawa N, Oosumi T, Whittier RF. Efficient isolation and mapping of *Arabidopsis thaliana* T-DNA insert junctions by thermal asymmetric interlaced PCR. Plant J 1995;8:457-463.

Maêda JM. Manual para uso da câmara de Neubauer para contagem de pólen em espécies florestais. Rio de Janeiro: UFRJ; 1985.

Magalhães Júnior AM. Ácido abscísico e o estresse abiótico. Pelotas: Embrapa Clima Temperado 2010;1-29.

Mahajan S, Tuteja N. Cold, salinity and drought stresses: an overview. Arch Biochem Biophys 2005; 444:139-158.

Miller JH. Experiments in molecular genetics. New York: Cold Spring Harbor; 1972.

Moshkin VA. Castor. New Delhi: Amerind Publishing; 1986.

Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiol Plant 1962;15:473-497.

Nakano T, Suzuki K, Fujimura T, Shinshi H. Genome-wide analysis of the ERF gene family in *Arabidopsis* and rice. Plant Physiol 2006;140:411-432.

Nguyen Ba AN, Pogoutse A, Provart N, Moses AM. NLStradamus: a simple Hidden Markov Model for nuclear localization signal prediction. BMC Bioinformatics 2009;10:202.

Nole-Wilson S, Krizek BA. DNA binding properties of the *Arabidopsis* floral development protein AINTEGUMENTA. Nucleic Acids Res 2000;28:4076-82.

Ohme-Takagi M, Shinshi H. Ethylene-inducible DNA binding proteins that interact with an ethylene-responsive element. Plant Cell 1995;7:173–182.

Pedersen AG, Nielsen H. Neural network prediction of translation initiation sites in eukaryotes: perspectives for EST and genome analysis. Intell Syst Mol Biol 1997;5:226-233.

Qureshi MI, Qadir S, Zolla L. Proteomics-based dissection of stress responsive pathways in plants. J Plant Physiol 2007;164:1239-1260.

Ribeiro SK. Aposta no biodiesel. Sci Amer Brasil 2006;53.

Riechmann JL, Heard J, Martin G, *et al.* *Arabidopsis* transcription factors: genome-wide comparative analysis among eukaryotes. Science 2000;290:2105-2110.

Riechmann JL, Meyerowitz EM. The AP2/EREBP family of plant transcription factors. Biol Chem 1998;379:633-646.

Rodrigues RFO, Oliveira F, Fonseca AM. As folhas de Palma Christi – *Ricinus communis* L. *Euphorbiaceae* Jussieu. Revisão de conhecimentos. *Rev Lecta* 2002;20:183-194.

Rogers HJ, Bate N, Combe J, Sullivan J, *et al.* Functional analysis of *cis*-regulatory elements within the promoter of the tobacco late pollen gene *g10*. *Plant Mol Biol* 2001;45:577-585.

Rushton PJ, Bokowiec MT, Han S, *et al.* Tobacco transcription factors: novel insights into transcriptional regulation in the *Solanaceae*. *Plant Physiol* 2008;147:280–295.

Saibo NJM, Lourenço T, Oliveira MM. Transcription factors and regulation of photosynthetic and related metabolism under environmental stresses. *Ann Bot* 2009;103: 609–623.

Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 1987;4:406-425.

Sakuma Y, Liu Q, Dubouzet JG, *et al.* DNA-binding specificity of the ERF/AP2 domain of *Arabidopsis* DREBs, transcription factors involved in dehydration- and cold-inducible gene expression. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;290:998-1000.

Santos RF, Kouri J, Barros MAL, *et al.* Aspectos Econômicos do Agronegócio da Mamona. In: Azevedo DMP, Beltrão NEM. O Agronegócio da Mamona no Brasil. Campina Grande: Embrapa Algodão 2007;23-41.

Savy Filho A. Melhoramento da mamona. In: Borém, A. Melhoramento de espécies cultivadas. Viçosa: UFV 1999;385-485.

Sharoni AM, Nuruzzaman M, Satoh K, *et al.* Gene structures, classification and expression models of the AP2/EREBP transcription factor family in rice. *Plant Cell Physiol* 2011;52:344-360.

Shen Q, Zhang P, Ho THD. Modular nature of ABA response complexes: composite promoter units that are necessary and sufficient for ABA-induced gene expression in barley. *Plant Cell* 1996;7:1107-1119.

Shen QJ, Casaretto JA, Zhang P, *et al.* Functional definition of ABA-response complexes: the promoter units necessary and sufficient for ABA induction of gene expression in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant Mol Biol* 2004;54:111-124.

Shen YG, Zhang WK, Yan DQ, *et al.* Characterization of a DRE-binding transcription factor from a halophyte *Atriplex hortensis*. *Theor Appl Genet* 2003;107:155–161.

Shinozaki K; Yamaguchi-Shinozaki K. Gene expression and signal transduction in water-stress response. *Plant Physiol* 1997;115: 327-334.

Simpson SD, Nakashima K, Narusaka Y, *et al.* Two different novel *cis*-acting elements of *erd1*, a *clpA* homologous *Arabidopsis* gene, function in induction by dehydration stress and dark-induced senescence. *Plant J* 2003;33:259-270.

Snider JL, Oosterhuis DM, Loka DA, Kawakami EM. High temperature limits *in vivo* pollen tube growth rates by altering diurnal carbohydrate balance in field-grown *Gossypium hirsutum* pistils. *J Plant Physiol* 2011;168:1168-1175.

Srivastav A, Mehta S, Lindlof A, Bhargava S. Over-represented promoter motifs in abiotic stress-induced *DREB* genes of rice and sorghum and their probable role in regulation of gene expression. *Plant Signal Behav* 2010;5:775-784.

Taiz L, Zeiger E. *Fisiologia Vegetal*. Porto Alegre: Artmed; 2004.

Tamura K, Peterson D, Peterson N, *et al.* MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* 2011;28:2731-2739.

Tebbutt SJ, Lonsdale DM. Deletion analysis of a tobacco pollen-specific polygalacturonase promoter. *Sex Plant Reprod* 1995; 8:242-246.

Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucl Acids Res 1994;22:4673-4680.

Tjaden G, Edwards JW, Coruzzi GM. *Cis* elements and *transacting* factors affecting regulation of a nonphotosynthetic light-regulated gene for chloroplast glutamine synthetase. Plant Physiol 1995;108:1109-1117.

Uno Y, Furihata T, Abe H, *et al.* *Arabidopsis* basic leucine zipper transcription factors involved in an abscisic acid-dependent signal transduction pathway under drought and high-salinity conditions. Proc Natl Acad Sci USA 2000;97:11632-11637.

Valente MAS, Faria JAQA, Soares-Ramos JRL, *et al.* (2009) The ER luminal binding protein (BiP) mediates an increase in drought tolerance in soybean and delays drought-induced leaf senescence in soybean and tobacco. J Exp Bot 2009;60: 533-546.

Wei G, Pan Y, Le J, Zhu Y. Molecular Cloning, Phylogenetic Analysis, Expressional Profiling and *in vitro* Studies of *TINY2* from *Arabidopsis thaliana*. J Biochem Mol Biol 2005;38:440-446.

Weiss EA. Oilseed crops. London: Longman 1983;660.

Xu Z, Chen M, Li L, Ma Y. Functions and Application of the AP2/ERF Transcription Factor Family in Crop Improvement. J Integrative Plant Biol 2011;53:570-585.

Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. A novel cis-acting element in an *Arabidopsis* gene involved in cellular responsiveness to drought, low temperature, or high-salt stress. Plant Cell 1994;6:251-64.

Zhang CH, Shangguan LF, Ma RJ *et al.* Genome-wide analysis of the AP2/ERF superfamily in peach (*Prunus persica*). Genet Mol Res 2012; *In press*.

Zhang G, Chen M, Li L, *et al.* Overexpression of the soybean *GmERF3* gene, an AP2/ERF type transcription factor for increased tolerances to salt, drought, and diseases in transgenic tobacco. J Exp Bot 2009;60:3781-3796.

Zhang X, Wollenweber B, Jiang D, *et al.* Water deficit and heat shock effects on photosynthesis of a transgenic *Arabidopsis thaliana* constitutively expressing ABP9, a bZIP transcription factor. J Exp Bot 2008;59:839-848.

Zhou M, Ma J, Pang J, *et al.* Regulation of plant stress response by dehydration responsive element binding (DREB) transcription factors. Afr J Biotechnol 2010;9:9255-9279.

INTERNATIONAL JOURNAL OF PLANT BIOLOGY

Characterization of a pollen-specific and desiccation-associated AP2/ERF type transcription factor gene from castor bean (*Ricinus communis* L.)

Thaís de Moura Cipriano (1,2), Angélica Taveira Morais (1,2), Francisco José Lima Aragão (1)

1. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF, Brazil
2. Universidade de Brasília, Departamento de Botânica, Campus Universitário Darcy Ribeiro, Brasília, DF, Brazil

Acknowledgements

We thank Elsa O. P. L. Nogueira for technical assistance. This study was partially supported by Embrapa and CNPq (Brazil). T.M.C. and A.T.M. were supported by a fellowship from CAPES (Brazil).

Correspondence: Francisco José Lima Aragão, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, PqEB W5 Norte, 70770-900 Brasília, DF, Brazil. Tel. +55-61-34484642; Fax: +55-61-34484777.

E-mail: francisco.aragao@embrapa.br

Key words: castor bean, dehydration stress, *DREB* gene, environmental stresses, pollen, promoter

Abstract

DREB transcription factors (TF) belong to the superfamily of AP2/ERF and their involvement in protein-protein interactions and DNA binding has been proposed. AP2/ERF proteins have important functions in the transcriptional regulation of a variety of biological processes related to growth and development, as well as various responses to environmental stimuli, regulating expression of plant biotic and abiotic stress-responsive genes. In this study an AP2/ERF TF gene (named *RcDREB1*) was isolated from castor bean (*Ricinus communis* L.) and its expression was analyzed in developing seeds, leaves, stems and flowers of plants cultivated under field conditions. Transcripts were only observed in pollen grains, peaking during anthesis. The *RcDREB1* deduced amino acid sequence was compared to other AP2/ERF TF proteins and presented 38–78% identity. Phylogenetic analysis classified it as a member of the CBF/DREB subfamily, rooting with the subgroup A-5. The *RcDREB1* promoter was fused to the *gus* reporter gene and used to transform tobacco. Transgenic plants were exposed to various abiotic stress treatments (low and high temperatures, drought, salinity and exogenous ABA) and no detectable GUS expression was observed, suggesting that the *RcDREB1* promoter is not active under tested conditions. *In silico* analyses revealed the presence of three copies of the regulatory late pollen-specific element (AGAAA) in the *RcDREB1* 5'-region. Interestingly, GUS expression was only observed in pollen grains, starting when the flower opened and initiating the senescence process; at this point, desiccated mature pollen grains are released from anthers. In addition, dehydrated developing pollen grains also expressed the *gus* gene. This is the first study on a DREB gene presenting pollen-specific expression.

Introduction

DREB transcription factors (TF) belong to the superfamily of AP2/ERF transcription factors. Each DREB/CBF protein contains a highly conserved APETALA2/Ethylene Responsive Factor (AP2/ERF) domain, which consists of 60 to 70 amino acids. The involvement of this domain in protein-protein interactions and DNA binding has been proposed.¹ In ERF the domain specifically

binds to the 11bp GCC box of the ethylene response element (ERE), a promoter element essential for ethylene responsiveness. The AP2/ERF proteins have important functions in the transcriptional regulation of a variety of biological processes related to growth and development, as well as various responses to environmental stimuli, regulating the expression of plant biotic and abiotic stress-responsive genes.^{2, 3} AP2/ERF genes constitute a large superfamily that has been divided into subfamilies (named AP2, RAV, CBF/DREB and ERF) based on their sequence similarities and numbers of AP2/ERF DNA binding domains.^{4, 5} AP2 subfamily proteins contain two repeated AP2/ERF domains and play a role in the regulation of plant developmental processes.^{6, 7, 8} RAV subfamily proteins contain a single AP2/ERF domain and a B3 domain, which is a DNA-binding domain conserved in other plant-specific transcription factors. The ERF subfamily genes are mainly involved in response to biotic stresses, such as pathogenesis, by recognizing the *cis*-acting element AGCGGCC, known as the GCC box.⁹

The CBF/DREB subfamily proteins are divided into six subgroups (A-1 to A-6).^{10, 11, 12} Expression of the *AtDREB1A/AtCBF3* (A-1) genes is induced by low temperature stress, but not by drought or high salt stresses, whereas *AtDREB2A* (A-2) genes are induced by drought and high salt, but not by low temperature.¹³ Other *DREB* genes such as *AtTINY2* (A-4), *GhDBP1* (A-5), *GmDREB2* (A-5), and *ZmDBF1* (A-6) have also been characterized as stress-inducible proteins, since they are ABA-responsive.^{14, 15, 16, 17}

CBF/DREB subfamily transcription factors have been identified and characterized in various plant species as being associated with the response to abiotic and biotic stresses and with control of flowering.⁶ In general, the CBF/DREB subfamily genes have been well studied in *Arabidopsis* and only a few members have been characterized in tropical plants, in which most of their functions remain to be determined.¹¹ In addition, in spite of the numerous physiological investigations into how DREB transcription factors regulate target genes, the transcriptional regulation of *DREB* genes itself has not been fully characterized.^{18, 19} Moreover, little is known about their spatial expression during plant organs' development under environmental stress. The objectives of this study were to isolate and characterize the expression of a CBF/DREB subfamily gene from castor bean (*Ricinus communis* L.). The promoter was fused to a report gene in order to study gene expression under different abiotic stresses and during the development of some organs. We found that the *AP2/ERF* gene (named *RcDREB1*) seems to be specifically expressed in mature pollen grains during the desiccation process.

Materials and Methods

Cloning the *RcDREB1* promoter and coding sequence

Total genomic DNA was isolated from leaves using the DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen Valencia, CA, USA). Degenerated primers DREB392 (5'-GCGACGTCRTGGRCACGAGCGGC-3') and DREB297 (5'-TGGGTGGSGGAAATTAGAGARCC-3') (R = G or A; S = G or C) based on conserved regions of available plant *DREB* genes were used to amplify an internal sequence from the *RcDREB* gene. Polymerase Chain Reactions (PCRs) were carried out in a thermocycler (MyCycler Thermal Cycler, BioRad) in 50 µL of solution containing 50 ng of DNA, 60 mM Tris-SO₄ (pH 8.9), 18 mM (NH₄)₂SO₄, 2mM MgSO₄, 250 nM of each dNTP, 200 nM of each primer and 5 U of Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen). The mixture was treated at 95 °C (5 min) and subjected to 35 cycles of amplification (95 °C for 1 min, 55 °C for 1 min, 68 °C for 1 min) with a final elongation cycle of 5 min at 68 °C. A 845 bp fragment was cloned into the pGEMT-Easy vector (Promega) and sequenced.

The 5' flanking region from the *RcDREB1* gene was obtained by Thermal Asymmetric Interlaced PCR (TAIL-PCR) according to Liu²⁰ with one essential modification: the use of 10 mer random primers instead of degenerate 16 mer as the short primers. On the basis of the 1,025 bp fragment DNA sequence of an *RcDREB1* gene, a total of two gene-specific primers in nested positions were designed (RCNESTEDR: 5'- AACAGGAGCGAATAAGAACC-3'; RCR2: 5'- ATCCTTGACCGCTTGTTTC-3'). Twenty arbitrary 10 mer primers were chosen from the 10 mer primer sets obtained from Operon Biotechnologies GmbH (www.operon.com). Three rounds of TAIL-PCR were carried out on an MJ Research thermocycler (PTC-100) using the diluted product

of the previous PCR as template for the next, and consecutively employing a common arbitrary primer and nested gene-specific primers. The primary TAIL-PCR was carried out in 25 μ L of reaction mixture containing 20 ng of genomic DNA, 10 μ M of the 10 mer OPE primer, 600mM Tris-SO₄ (pH 8.9), 18mM (NH₄)₂SO₄, 50mM of the MgSO₄, 10mM of dNTP mixture, 5 U/ μ L of the Platinum Taq High Fidelity (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). The final product of the primary reaction was diluted 1:50 in sterile water and secondary 1:100, which were used as templates in the secondary and tertiary reactions, respectively. In addition, each reaction provided a specific program for fragment amplification.

The secondary TAIL-PCR was carried out with the gene-specific primer RCNESTEDR in combination with the same arbitrary primer as used in the primary PCR. The reaction solution was the same as for the primary PCR, except that 1 μ L of a 50-fold dilution of the primary PCR product was used as template. For the tertiary TAIL-PCR, the gene-specific primer RCR2 was used with the same arbitrary primer. The reaction solution for the tertiary PCR was the same as for the primary PCR except that 1 μ L of a 50-fold dilution of the secondary PCR product was used as template, and the concentration of the arbitrary primer was 500 nM instead of 2 μ M. Reactions were carried out as described by Liu,²⁰ except that the annealing temperature for the low-stringency cycle was set to 29°C, instead of 44°C. The PCR products were separated onto a 1% agarose gel, stained with ethidium bromide and visualized with UV light. Discrete products from the tertiary PCR were purified using the Kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) and the fragments cloned into the pGEMT-Easy vector (Promega) and sequenced.

To obtain a full-length *RcDREB1* cDNA sequence, 5'- and 3'-rapid amplifications of cDNA ends (RACE)-PCR were carried out. Gene-specific primers were designed from the internal sequenced fragment and the cDNA end was amplified by using the 5'- and 3'-RACE System (Invitrogen), using the reverse specific nested primer DREBRcRACER (5'-AAGCCTTGACAGACGGGCCTC-3') in combination with the GeneRacer 5'-Primer (Invitrogen), and the forward specific primer DREBRcRACEF (5'-CGGCCGCTCGAGCCTATGAC-3') in combination with GeneRacer Oligo dT (Invitrogen). Nested PCRs were carried out as described above. PCR products were cloned into the pGEMT-Easy vector (Invitrogen) and sequenced.

All fragments and vector were sequenced by Macrogen Inc (Korea).

Sequence and phylogenetic analyses

All similarity searches were executed locally using the BlastN, BlastX, or BlastP tools at the NCBI web site. Motif detection was performed with MEME version 4.7.0.²¹ *RcDREB1* promoter was screened for *cis*-elements using the web-based PlantCARE and PLACE/Signal Scan platforms.^{22, 23} The relationship between the *RcDREB1* and AP2/ERF transcription factor genes was determined by aligning it with sequences available at GenBank (www.ncbi.nih.nlm.gov) and the TIGR Gene Indices. Only complete coding sequences were used for analysis. The alignment was performed using CLUSTAL W.²⁴ Phylogenetic and molecular evolutionary analyses were conducted using MEGA version 5.²⁵ Phylogenetic trees were constructed using the Neighbour-joining algorithm Bootstrap values were computed using 1000 replicates to evaluate support for the groupings.²⁶

Protein sequence was *in silico* analyzed using NetStart 1.0, TargetP 1.1 and NLStradamus.^{27, 28, 29}

RT-PCR expression analysis

Developing seeds (5, 10, 15, and 20 d after pollination), leaves, ovules, pollen grains (from anthers of male flowers during anthesis, 1 and 2 days before anthesis and 2 days after anthesis), stems, and flowers were removed from plants cultivated under field conditions and used for total RNA extraction as previously described by Abreu and Aragão.³⁰ Anthers were partially dehiscent at the time of pollen harvest on the day of anthesis. They were completely dehiscent and much reduced in size by the day after anthesis. Total RNA extraction, cDNA synthesis and RT-PCR were carried out according to Abreu and Aragão.³⁰ The number of amplification cycles was previously optimized in order to stop the reaction at the exponential stage, ensuring that amplification was semi-quantitative. Primers RCDREBF (5'-AGAGTCGATGCTCTTGAAACCGCT-3') and RCDREBR

(5'-TCCGAATCTTCCGGGTCGGGT-3') were used to amplify a 227 bp fragment from the *RcDREB1*. As an internal control, primers EF1F (5'-TGTTGCTGTTAAGGATTTGAAGCG-3') and EF1R (5'-AACAGTTTGACGCATGTCCCTAAC-3') were utilized to amplify 358 bp within the castor bean housekeeping gene, *RcEFa*, elongation factor EF-1a. Fragments of the *RcDREB1* amplified from pollen were cloned into the pGEMT-Easy and sequenced.

Abiotic treatments

Transgenic and non-transgenic tobacco plants (from three lines) were subjected to various abiotic stresses according to Gutha and Reddy,³¹ with modifications. Tests were performed on soil, under hydroponic and *in vitro* conditions. Tissues (leaf, root and stem) were collected and tested for GUS expression.

For experiments carried out under soil conditions, 40-day-old plants (n=12) were submitted to drought, high salinity, and low and high temperatures. For water deficit stress treatment, watering was withheld for 15 days and samples collected daily. For high-salinity treatments, plants were irrigated with 100 mL of solution containing 600mM NaCl for seven days and samples collected daily. For low-temperature treatment, the plants were incubated at 10 °C, 75% RH, 16h-photoperiod for two days and samples collected daily. For high temperature treatment, plants were incubated at 45°C, 15% RH, 16h-photoperiod during seven days and samples were collected at 0, 2, 6, and 24 h on the first day, followed by sample collections every 24h for six days.

For experiments carried out under hydroponic conditions, 8-day-old plants (n=6) were cultivated at 16h-photoperiod and submitted to salinity and ABA treatments. For salinity stress treatment, plants were cultivated in contact with aqueous solution containing 250 mM NaCl for five days and samples were collected every hour for the first 6h and every 24h for five days. For hormone treatment, plants were cultivated in presence of 200µM ABA (abscisic acid) for seven days and samples were collected every hour for the first 6h and every 24h for five days.

For experiments carried out under *in vitro* conditions, 7-day-old seedlings (n=10) were cultured in Petri dishes (9 cm diameter) containing MS medium supplemented with 100 µM ABA, or 10%PEG, or 200 mM mannitol, or 200 mM NaCl for 15 days.³² Samples were collected every seven days.

GUS expression regulated by the *RcDREB1* promoter

The 859-bp 5'-region of the *RcDREB1* gene was cloned upstream of the *uidA* coding region (*gus*) to create a promoter-*gus* fusion. Primer pair RcDPNcoR (5'-TCCATGGATGGAGACAAATAATCACTC-3') and RcDPKpn (5'-CGGTACCCCTTAGGACTATACACCTC-3'), including the sites for *NcoI* and *KpnI* (underlined) were used to amplify the 5' flanking region from the *RcDREB1* by PCR. Reaction was carried out as previously described using 5 U of Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen). The amplified fragment was cloned into the pGEMT-Easy vector (Promega) and re-sequenced. The 5' region from the *RcDREB1* gene was excised from pGEMTEasy with *BamHI/NcoI* and inserted into the vector pCambia 3201 (CAMBIA, Camberra Australia), replacing the 35S CaMV promoter, to generate the plasmid pRcDREBGUS.

The plasmid vector pRcDREBGUS was transferred to *Agrobacterium tumefaciens* strain LBA4404, which was used to transform tobacco as previously described.³³ Transgenic plants were selected using the herbicide glufosinate ammonium and tested for presence of the phosphinothricin acetyltransferase using the Trait LL Test Kit, (Strategic Diagnostic Inc.). Regenerated transgenic plantlets were acclimatized and allowed to set seeds.

GUS histochemical assay

The gene expression in all vegetative and reproductive organs, at different developmental stages, was analyzed by a histochemical assay of the *gus* gene according to Jefferson.³⁴ Pollen grains were removed from anthers at eight stages (a-h) corresponding to the stages 1 (=a), 2 (=b), 6 (=c), 8 (=d), 11 (=e) and 12 (=f), as previously described.³⁵ Stages g and h correspond to flower senescence events.

Results

Cloning of a *DREB* gene from *R. communis*

Using PCR with degenerated primers, TAIL-PCR and 5'- and 3'-(RACE)-PCR it was possible to obtain a 1,781 bp sequence from *R. communis* genome. The sequence was entered in the NCBI GenBank database with the accession number JQ361741. The cDNA contains one open reading frame of 588 bp encoding 195 amino acids with predicted molecular mass of 21.7 kDa (pI 7.08), 1,025 pb corresponding to the 5'-region and 169 bp corresponding to the 3'-region. Translation start was predicted using the NetStart 1.0.²⁷ The deduced amino acid sequence was used to compare the amino acid composition of the *RcDREB1* polypeptide with those of other plant AP2/ERF TFs, and presented 38–78% identity for overall amino acid sequence. *RcDREB1* was predicted to encode a single AP2/ERF domain (in the position 26-82) with 94–99% identity. No B3 domain was found. The nucleotide sequence of the intronless putative *RcDREB1* gene-coding region was compared with sequences of AP2/ERF genes from *Viridiplantae* available in the GenBank and TIGR databases. The amino acid residues E₁₆, W₂₇, L₂₈, and G₂₉ from AP2/ERF *RcDREB1* domain were conserved when compared with all 220 AP2/ERF proteins identified in soybean and *Arabidopsis thaliana*. In addition, the residues R₈ and G₂₉ were completely conserved when compared with all 139 AP2/ERF proteins identified in rice (*Oryza sativa*). The TargetP 1.1 algorithm predicted no chloroplast transit or mitochondrial targeting signal peptides in the N-terminal region of the *RcDREB1*.²⁸ The NLStradamus predicted a putative nuclear localization signal (NLS) domain.²⁹

Conserved motifs outside of the AP2/ERF *RcDREB1* domain were examined using MEME. Some conserved motifs identified in the *Arabidopsis* and *Glycine max* ERF family proteins were also observed in the deduced amino acid sequences of *RcDREB1*. The ERF-associated amphiphilic repression (EAR) motif [D(L/M)NxxP] was found in the C-terminal region. However, the LxLxL type of EAR motif is not present. ERF protein signature (FKGIRMRKWGKW), the Transcription initiation factor TFIID motifs (SSSNNNNNSN and SSSSNNNNNS) and a potential PEST motif (KVPDPEDSDVEWER) were also found.

Sequence analysis of the 5'-region of the *RcDREB1* revealed that no typical TATA boxes (TATAWAW; W= A/T) were found. However, five TATA boxes were detected that had previously been detected in the 5' upstream region of *Pisum sativum* glutamine synthetase gene and confirmed as a TATA element by *in vivo* analysis (Figure 1).³⁶ In addition, the *erd1* (ACGTG; early response to dehydration element)³⁷ was found at -202 position. There were five CAAT boxes. To identify regulatory elements, the 5' upstream sequence was analyzed by using PlantCARE database and PLACE database. Motifs AGAAA and GTGA, two *cis*-acting regulatory elements that are known to be involved in pollen/anther-specific expression, were detected (Figure 1). There were three copies of AGAAA motifs and three copies of GTGA motifs. So many copies of AGAAA and GTGA motifs suggested that this promoter might be a specific pollen/anther promoter.

-863 TAATCCCTTAGGACTATACACCTCACTCTTCCTTTTATTCATTCATTAACTATTTTTAT
 -803 AAACAATATCTCTCAGCATAAACAATATCTCCAATTTGATATTGTAATTTATGATAATAG
 -743 ATTAAATTTTCATTTTTCAAATGCTGAAAATTATTATTTTCATGTGTATACTATAATGCA
 -683 AGAAATAAGTTTTAGAAACCTACAACATTTTATAATTTGTTTATTTATTTTATTAATAAA
 -623 TTATAATTTTATTAATTTTAAATATAGCTTTATAATTTGTTTATTTAAATTTATTATATA
 -563 GTAATTAATTTATATTTAATATAAAAAAGAATATTTTATAGTATATATACTTGTTTTAAA
 -503 TAAAAATTACTTCAAAAAATATACAAACGAGGAAGGCATTCTCTCTCTCTCTCTCTCTC
 -443 TCTCTCTCTCTCTCCCTCTCTTTCTCTCTCGCCCTATAAGGGAAACAACATAAACACACC
 -383 CTTACACTCGCACAGACAACAGCACAAAGCCTTTCTTTTTCATTTTCTTTCCCTTTAA
 -323 ACAATTTCCACAAAGATTTGTGTCGGTGAATTTGGATTTTCTATCTTTATTTTCTTTTTC
 -263 CCCTTATCAAACCCCATCTCTTAATATTAAAAAATAAAAAACAAAACCCAAAAATCACAATC
 -203 AACGTGTAAGCTTACCTGAATGACACCCCGTTTCTTTTTCATACCCAGCTGAGCAGAGCT
 -143 CTACCCATGAAAACCCATCTTCTCTAAACTAAACTCCTTCTCCATGAAAGCTCGGTAAC
 -83 ATCTTCGCTTAGGTTTCTTCAATTTTTTTTTAGTGATACAAAAATAAAAAAGAAAGAAATT
 -23 CGAGTGATTATTTGTCTCCATACATGAAATGGAAGGCGAAACGGAGAAGGTGATAACAA

Figure 1. Nucleotide sequence of *RcDREB1* promoter. Numbering is from the first base of translation start site (+1). Putative TATA, CAAT boxes and the translation start point ATG are shown in rectangular boxes. Pollen-specific *cis*-elements (AGAAA and GTGA) (gray background) and *erd1* (early response to dehydration element) (underlined) are denoted.

Phylogenetic analysis

To classify and to analyze the phylogenetic relationships, multiple alignment analysis of the amino acid sequences of the AP2/ERF domain in the *RcDREB1* was carried out. Based on alignment, an NJ phylogenetic tree was generated, which divided AP2/ERF proteins into clusters in agreement with the subfamily (Figure 2). This phylogenetic tree suggested that the *RcDREB1* belongs to the CBF/DREB subfamily. The second phylogenetic analysis was carried out with CBF/DREB subfamily protein sequences (Figure 3). The phylogenetic tree divided the proteins into six subgroups, designated A-1 to A-6, in accordance with the classification described by Sakuma.¹¹ The *RcDREB1* grouped with the subgroup A-5.

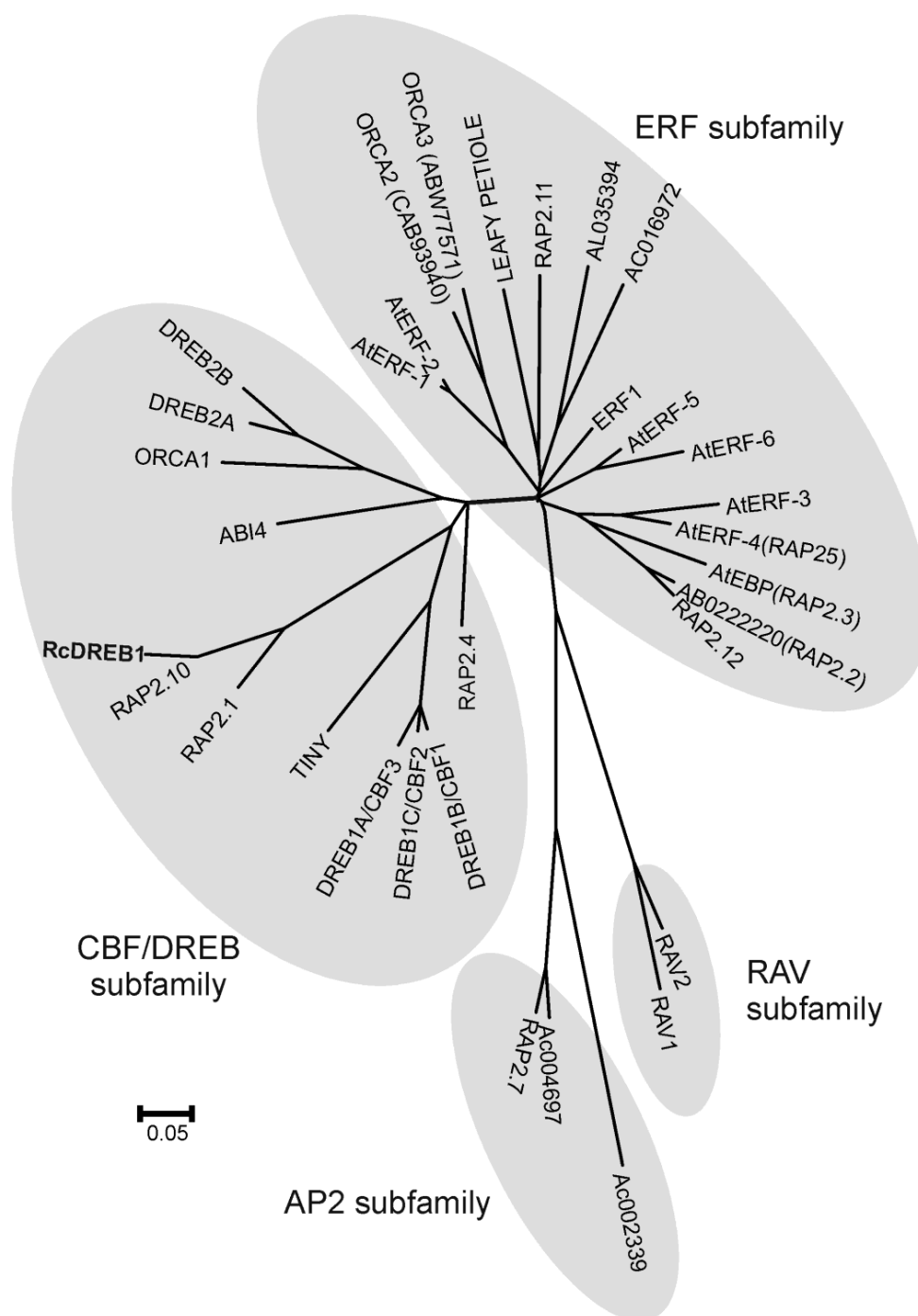


Figure 2. Phylogenetic analysis of RcDREB1 with other AP2/ERF proteins. The RcDREB1 grouped with the CBF/DREB subfamily. The amino acid sequences of the AP2/ERF domains were aligned by Clustal W and the phylogenetic tree was constructed using MEGA 5 with Neighbor-Joining method. The tree includes AP2 domains available in GenBank and TIGR databases. Cut-off bootstrap values >50 % were considered for the consensus tree.

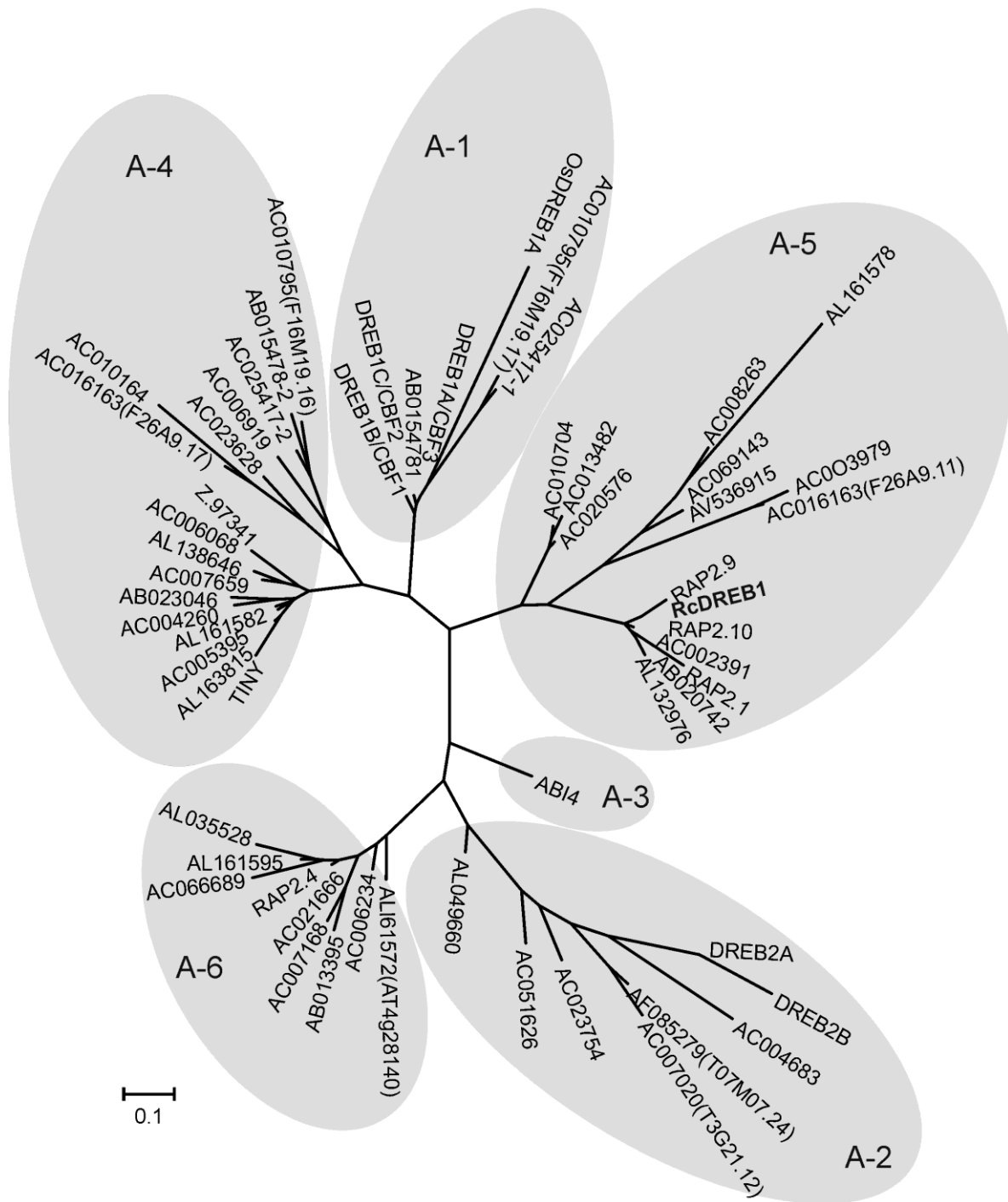


Figure 3. Phylogenetic analysis of RcDREB1 with other DREB proteins. The RcDREB1 grouped with the A-5 subgroup. The amino acid sequences were aligned by Clustal W and the phylogenetic tree was constructed using MEGA 5.0 and the Neighbor-Joining method. The tree includes AP2 domains available in GenBank and TIGR databases. Cut-off bootstrap values >50 % were considered for the consensus tree.

Levels of *RcDREB1* transcripts in organs of *R. communis*

RT-PCR expression analyses were carried out to detect endogenous *RcDREB1* transcripts in different *R. communis* organs and developing seeds. The results revealed the absence of *RcDREB1* transcripts developing seeds, leaves, ovules, stems and flowers of plants cultivated under field conditions (data not shown). *RcDREB1* transcripts were observed pollen grains, peaking during anthesis (Figure 4). However, can not definitively conclude that only the *RcDREB1* is being expressed, because other *DREB* genes are present in the castor bean genome and these genes have a high degree of sequence similarity.

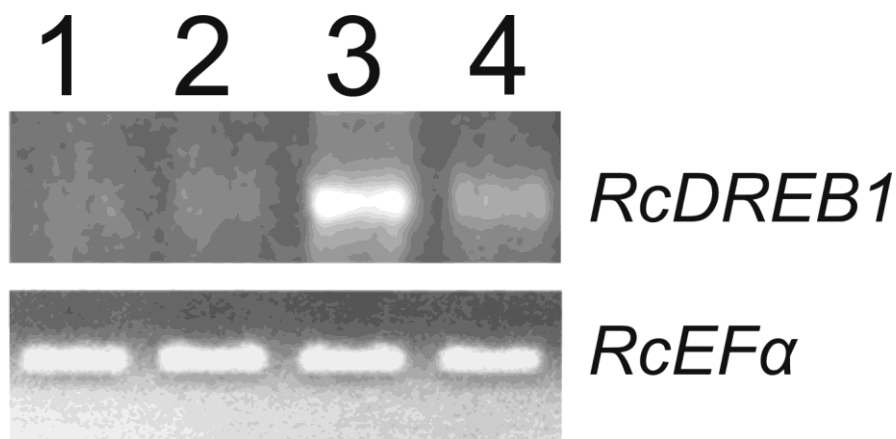


Figure 4. Expression of the *RcDREB1* gene in castor bean pollen grains from male flowers 1 and 2 days before anthesis (1, 2), during anthesis (3) and 2 days after anthesis (4). The upper bands are consistent with the expected fragment amplified from the *RcDREB1* gene and the lower band corresponds to transcripts from the *RcEFα* gene (elongation factor EF-1α; internal control).

GUS expression under control of the *RcDREB1* promoter

To determine whether the *RcDREB1* promoter would be functional under stress conditions, the 3'-region of the gene was fused to the *gus* reporter gene coding sequencing. Fifteen transgenic tobacco lines were achieved, transformed with the *RcDREB1* promoter-*gus* fusion, and three lines were used for further experiments.

Plants cultivated in the soil, under hydroponic and *in vitro* conditions were exposed to various abiotic stress treatments (low and high temperatures, drought, salinity and exogenous ABA). Expression of the GUS-reporter gene was examined in different tissues of the transgenic lines. Random samples of leaves, stems and roots of the T₁ plants did not show any visible histochemical GUS staining, suggesting that the *RcDREB1* promoter is not active under tested conditions.

Transgenic plants were allowed to develop under greenhouse conditions with normal irrigation regime and analyzed for GUS expression. No expression could be detected in leaves, stems, roots, petals, sepals and ovaries. Later, GUS expression was investigated during microspore/pollen development. Interestingly, it was possible to detect intense expression levels of the *gus* gene driven by the *RcDREB1* promoter (Figure 5) at some stages of pollen development. The frequency of blue-staining pollen was higher at stages f and g (99 and 97% respectively), when the flowers are open and anthers dehiscent, releasing pollen grains (Figure 5f and g). At stages c, d and e it was possible to visualize a frequency of 6, 11 and 19% (respectively) of pollen grains expressing the *gus* gene (Figure 5c-e). At these stages (c to e), *gus* expression was observed only in desiccated pollen grains. It is in agreement with the expression peaking during anthesis of castor bean anthers. At stage h flowers initiated senescence and the GUS was observed in about 50% of the pollens presenting dehydration. No *gus* expression was detected in pollen of non-transgenic

tobacco plants. In all cases, the positive control line transformed with the CaMV 35S promoter driving the *gus* showed intense blue staining (data not shown).

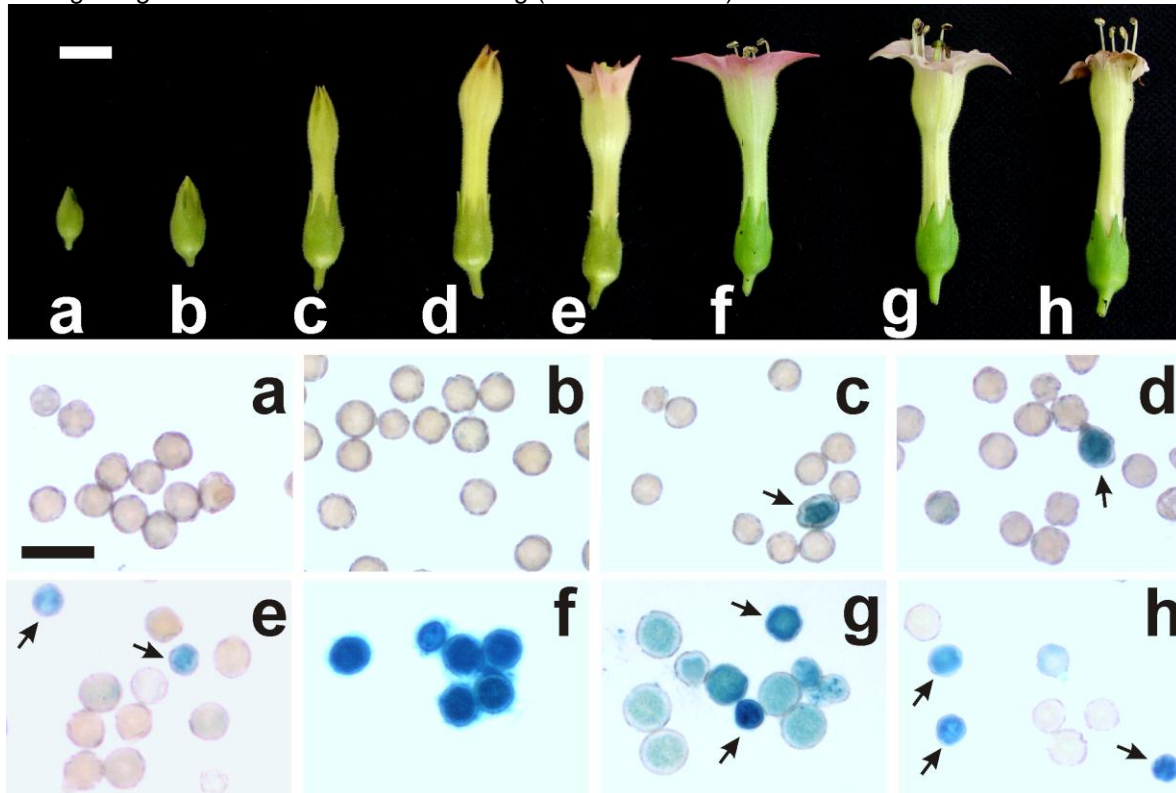


Figure 5. *RcDREB1* promoter controlling GUS expression during pollen/microspore grains development in transgenic tobacco plants. At stage a, the anthers and pistil are fully differentiated. Stage b: calyx opens slightly at top of bud; stage c: corolla tube bulges at tip of calyx; stage d: corolla is elongating and petals are green and slightly open. Stage e: corolla limb is semi open and stigma and anthers are visible. Stage f: flower open and anthers dehiscent, and corolla limb is fully expanded and deep pink. Stages g and h: flower in senescent. Arrows point to dehydrated pollen grains in c to h. White bar in the upper panel corresponds to 1 cm and serves as scale for flowers. Black bar corresponds to 50 μ m and serves as scale for pollen grains in a to h.

Discussion

In this study, the first member of the AP2/ERF transcription factor family, named *RcDREB1*, was characterized in castor bean, a perennial tropical species that presents natural tolerance to drought, low fertility soils and high temperature. Plants have biochemical mechanisms to tolerate stress and respond to these conditions with an array of biochemical and physiological changes, which involve the expression of many genes to promote the ability of the plant to survive these stress conditions. A significant number of these changes was shown to be under the control of the DREB factor pathway.^{38, 39} These transcription factors activate/regulate the expression of a number of downstream genes that play important roles in environmental stress tolerance. Many plant species, especially those of tropical origin, have to respond and adapt to stresses at the physiological and biochemical levels, in a plastic and rapid manner. Nevertheless the isolated castor bean *DREB* gene did not presented expression in several tissues. Surprisingly, *RcDREB1* expression was only observed in pollen cells with maximum values being during anthesis.

According to Sakuma,¹¹ the CBF/DREB and ERF subfamilies differ by two conserved amino acid residues in the AP2/ERF domain. In AtDREB protein, a valine and glutamic acid are conserved in positions 14 and 19 respectively, while in ERF proteins alanine and aspartic acid residues are

conserved at these positions. In agreement with other CBF/DREB subfamily proteins, *RcDREB1* has the V₁₄ and E₁₉ amino acid residues in the AP2/ERF domain, suggesting it is a member of the CBF/DREB subfamily. In addition, phylogenetic analyses revealed that the *RcDREB1* grouped in the DREB subfamily.

Further phylogenetic analysis positioned *RcDREB1* in A-5 subgroup CBF/DREB of the CBF/DREB subfamily, according to the classification proposed by Sakuma.¹¹ Some DREB proteins from the subgroup A-5 have been characterized as stress-inducible proteins, since they are ABA-responsive.^{14, 15, 16, 17}

Out of more than 140 AP2/ERF domain proteins predicted to be encoded by *Arabidopsis*, and also in *Brassica napus*, wheat, rye, and tomato, only CBFs were found to have immediately upstream (PKK/RPAGRxKFxETRHP) and downstream (DSAWR) signatures surrounding the AP2/ERF domain. The domains PK(K/R)PAGRxKFxETRHP and DSAWR were not detected in the *RcDREB1*, corroborating the suggestion that it is not a CBF protein. In addition, these signatures are not present in the *Arabidopsis* AP2/ERF protein AtDREB2a.^{13, 40}

The ERF-associated amphiphilic repression (EAR) motif is present in the *RcDREB1*. Zhang¹² have shown the EAR motif sequences conserved in the C-terminal region of subgroup A-5 of the CBF/DREB subfamily proteins in soybean and *Arabidopsis*.

Conserved motifs outside the AP2/ERF *RcDREB1* domain were examined using MEME. Some conserved motifs identified in the *Arabidopsis* and *Glycine max* ERF family proteins were also observed in the deduced amino acid sequences of *RcDREB1*. The ERF-associated amphiphilic repression (EAR) motif [D(L/M)NxxP] was found in the C-terminal region, but not the LxLxL type of EAR motif. ERF protein signature (FKGIRMRKWGKW), the Transcription initiation factor TFIID motifs (SSNNNNNNNSN and SSSNNNNNNNS) and a potential PEST motif with 12 amino acids (KVPDPEDSDVEWER) were also found. EAR is a transcriptional regulatory motif identified in members of the ERF, C2H2, and auxin/indole-3-acetic acid families of transcriptional regulators. *Arabidopsis* EAR motif-containing proteins described in the literature are divided into two groups based on the sequence conservation pattern within the core EAR motif sites.⁴¹ The DLNxxP motif is conserved in some members of class II ERFs, TFIIA-type ZFPs, and ABI3/VP1 family proteins, while the LxLxL motif is conserved in AUX/IAAs and some members of the MYB and HD-Zip family proteins. ERF protein signature and the transcription initiation factor TFIID motifs were also found.

In this study, transgenic tobacco lines were generated to express the *gus* report gene under control of the *RcDREB1* promoter. Although a single ABA-responsive element (ABRE) was identified in the 5' *RcDREB1*, the 5' *RcDREB1::gus* fusion was not functional in either *in vitro* or hydroponic conditions under ABA treatments. It has been shown that ABRE is necessary but not sufficient for ABA-induced gene expression. An additional element is usually required for high level ABA-induction, such as CE1 and CE3, which were not found in the 5' *RcDREB1*.^{42, 43} Two ABRE sequences are necessary for the expression of *Arabidopsis RD29B* in seeds and for the ABA-responsive expression of *RD29B* in vegetative tissue.⁴⁴

The *RcDREB1* expression pattern is very different from the other DREB proteins from subgroup A-5. Characterization of the *DREB* gene from *Physcomitrella patens* (*PpDBF1*) revealed transcript accumulation under various abiotic stresses [water deficit, high salinity (NaCl), low temperature] and phytohormone treatments (ABA).⁴⁵ In addition, transgenic tobacco plants overexpressing the *PpDBF1* gained higher tolerance to salt, drought and cold stresses. Previous reports have suggested that there are different expression mechanisms among the three *AtCBF/DREB* genes. For instance, the *ICE1* gene that encodes a MYC-like bHLH protein was identified as being an expression regulator of *AtCBF3/AtDREB1A* but not of other *AtCBF/AtDREB1* genes.⁴⁶

Flower senescence is associated with increased ethylene production in many flowers.⁴⁷ GUS expression was only observed in pollen grains, which start to appear when the flower opens and initiate the senescence process, after which desiccated mature pollen grains are dispersed from anthers onto the stigma surface covered with sticky exudates and ready for fertilization. Interestingly, the *RcDREB1* promoter analysis revealed the presence of three copies of the regulatory late pollen-specific element (POLLEN1LELAT52; AGAAA) responsible for pollen specific gene expression in tomato, tobacco and wheat.^{48, 49, 50, 51, 52} The tomato *lat52* gene encodes a

cysteine-rich protein preferentially transcribed in the vegetative cell during pollen maturation. Analyses of the organization and role of *cis*-regulatory elements in controlling the precise developmental and tissue-specific expression of *lat52* during pollen development revealed that *cis*-regulatory elements required for pollen-specific transcription were located within the upstream region 492 to 52. Three independent activator domains were identified, each sufficient to activate the minimal CaMV 35S promoter in a pollen-specific manner.⁴⁹ Similarly, a construction of *gus* coding sequence controlled by the *LeMAN5* promoter, which contains four copies of POLLEN1LELAT52, was used to transform *Arabidopsis*. GUS activity was not detected in roots, stems, leaves, and siliques, but intense GUS staining was observed in anthers and pollen grains of developing and open flowers of the transformants.⁵¹

The viability of pollen is one of the most important factors that have direct influence on the success of fertilization and seed production, being an important component of crop yield. Castor bean is indigenous to the southeastern Mediterranean Basin, Eastern Africa, and India, but is widespread throughout tropical and subtropical regions (mostly in arid zones), where temperatures remain fairly high throughout the growing season of 140 to 180 days. In general, the castor bean inflorescence is a monoecious raceme, with female flowers located at the apex and male flowers at the base. Dehiscence of anthers occurs very rapidly, pollen grains are released in 3 to 5 minutes and wind dispersed to reach other flowers of the same plant or of other plants.⁵³ At that moment pollen grains often have to cope with environmental stress. Consequently, the protection of the pollen grains from adverse environmental conditions is crucial. Studies on molecular mechanisms involved in pollen survival during dispersion and pollination are of ecological and agronomic relevance and castor bean could be an excellent model.

In conclusion, our results show that *RcDREB1* encodes a novel DRE-binding transcription factor that is not activated by various environmental stresses and ABA in leaf, stem and root. Interestingly, among the tests that were carried out, we observed that the *RcDREB1* promoter was only functional in dehydrated pollen grains or at the moment that desiccated mature pollen grains are ready to be dispersed from anthers, being exposed to the external environment. To our knowledge, this is the first report on the characterization of DREB transcription factors isolated from castor bean and specifically functional in pollen grains. It has been demonstrated that moderate temperature increases could strongly influence pollen development.⁵⁴ Results of the present study could be the foundation for production of crops with highly stress-tolerant pollen, which could have an impact on productivity in a scenario of increasing temperatures, such as those projected to result from global climate change. In addition, pollen-specific promoters have the potential to target genes of biotechnological interest in pollen grains. As a potential application, engineered plants with long-life pollen grains could be produced, increasing pollination and in consequence, productivity.

References

1. Riechmann JL, Meyerowitz EM. The AP2/EREBP family of plant transcription factors. *Biol Chem* 1998;379:633-646.
2. Agarwal PK, Agarwal P, Reddy MK, Sopory SK. Role of DREB transcription factors in abiotic and biotic stress tolerance in plants. *Plant Cell Rep* 2006;25:1263-1274.
3. Sharoni AM, Nuruzzaman M, Satoh K, et al. Gene structures, classification and expression models of the AP2/EREBP transcription factor family in rice. *Plant Cell Physiol* 2011;52:344-360.
4. Nakano T, Suzuki K, Fujimura T, Shinshi H. Genome-wide analysis of the ERF gene family in *Arabidopsis* and rice. *Plant Physiol* 2006;140:411-432.
5. Xu Z, Chen M, Li L, Ma Y. Functions and application of the AP2/ERF transcription factor family in crop improvement. *J Integrative Plant Biol* 2011;53:570-585.
6. Elliott RC, Betzner AS, Huttner E, et al. AINTEGUMENTA, an APETALA2-like gene of *Arabidopsis* with pleiotropic roles in ovule development and floral organ growth. *Plant Cell* 1996;8:155-168.
7. Chuck G, Meeley R, Hake S. The control of maize spikelet meristem fate by the APETALA2-like gene indeterminate spikelet1. *Genes Dev* 1998;12:1145-1154.
8. Boutilier K, Offringa R, Sharma V K, et al. Ectopic expression of BABY BOOM triggers a conversion from vegetative to embryonic growth. *Plant Cell* 2002;14:1737-1749.
9. Hao D, Ohme-Takagi M, Sarai A. Unique mode of GCC box recognition by the DNA-binding domain of ethylene-responsive element-binding factor (ERF domain) in plants. *J Biol Chem* 1998;273:26857-26861.
10. Riechmann JL, Heard J, Martin G, et al. *Arabidopsis* transcription factors: genome-wide comparative analysis among eukaryotes. *Science* 2000;290:2105-2110.
11. Sakuma Y, Liu Q, Dubouzet JG, et al. DNA-binding specificity of the ERF/AP2 domain of *Arabidopsis* DREBs, transcription factors involved in dehydration- and cold-inducible gene expression. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;290:998-1000.
12. Zhang X, Wollenweber B, Jiang D, et al. Water deficit and heat shock effects on photosynthesis of a transgenic *Arabidopsis thaliana* constitutively expressing ABP9, a bZIP transcription factor. *J Exp Bot* 2008;59:839-848.
13. Liu Q, Kasuga M, Sakuma Y, et al. Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought- and low-temperature responsive gene expression, respectively, in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 1998;10:1391-1406.
14. Kizis D, Pages M. Maize DRE-binding proteins DBF1 and DBF2 are involved in *rab17* regulation through the drought responsive element in an ABA-dependent pathway. *Plant J* 2002;30:679-689.
15. Wei G, Pan Y, Le J, Zhu Y. Molecular Cloning, Phylogenetic Analysis, Expressional Profiling and *in vitro* Studies of *TINY2* from *Arabidopsis thaliana*. *J Biochem Mol Biol* 2005;38:440-446.
16. Huang B, Liu JY. A cotton dehydration responsive element binding protein functions as a transcriptional repressor of DRE mediated gene expression. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;343:1023-1031.
17. Chen M, Wang QY, Cheng XG, et al. *GmDREB2*, a soybean DRE-binding transcription factor, conferred drought and high-salt tolerance in transgenic plants. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;353:299-305.
18. Zhang G, Chen M, Li L, et al. Overexpression of the soybean *GmERF3* gene, an AP2/ERF type transcription factor for increased tolerances to salt, drought, and diseases in transgenic tobacco. *J Exp Bot* 2009;60:3781-3796.
19. Kim J-S, Mizoi J, Yoshida T, et al. An ABRE promoter sequence is involved in osmotic stress-responsive expression of the *DREB2A* gene, which encodes a transcription factor regulating drought-inducible genes in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol* 2011;52:2136-2146.
20. Liu Y-G, Mitsukawa N, Oosumi T, Whittier RF. Efficient isolation and mapping of *Arabidopsis thaliana* T-DNA insert junctions by thermal asymmetric interlaced PCR. *Plant J* 1995;8:457-463.
21. Bailey TL, Bodén M, Buske FA, et al. MEME SUITE: tools for motif discovery and searching. *Nucl Acids Res* 2009; 37:W202-W208.

22. Lescot M, Déhais P, Thijs G, et al. PlantCARE, a database of plant *cis*-acting regulatory elements and a portal to tools for *in silico* analysis of promoter sequences. *Nucl Acids Res* 2002;30:325-327.
23. Higo K, Ugawa Y, Iwamoto M, Korenaga T. Plant *cis*-acting regulatory DNA elements (PLACE) database. *Nucl Acids Res* 1999;27:297-300.
24. Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucl Acids Res* 1994;22:4673-4680.
25. Tamura K, Peterson D, Peterson N, et al. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* 2011;28:2731-2739.
26. Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 1987;4:406-425.
27. Pedersen AG, Nielsen H. Neural network prediction of translation initiation sites in eukaryotes: perspectives for EST and genome analysis. *Intell Syst Mol Biol* 1997;5:226-233.
28. Emanuelsson O, Brunak S, von Heijne G, Nielsen K. Locating proteins in the cell using TargetP, SignalP, and related tools. *Nat Protoc* 2007; 2: 953-971.
29. Nguyen Ba AN, Pogoutse A, Provart N, Moses AM. NLStradamus: a simple Hidden Markov Model for nuclear localization signal prediction. *BMC Bioinformatics* 2009;10:202.
30. Abreu EFM, Aragão FJL. Isolation and characterization of a myo-inositol-1-phosphate synthase gene from yellow passion fruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) expressed during seed development and environmental stress. *Ann Bot* 2007;99: 285-292.
31. Gutha LR, Reddy AR. Rice *DREB1B* promoter shows distinct stress-specific responses, and the overexpression of cDNA in tobacco confers improved abiotic and biotic stress tolerance. *Plant Mol Biol* 2008;68:533-555.
32. Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 1962;15:473-497.
33. Horsch RB, Rogers SG, Fraley RT. Transgenic plants. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* 1985;50:433-437.
34. Jefferson RA, Burgess SM, Hirsh D. Beta-glucuronidase from *Escherichia coli* as a gene-fusion marker. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;83:8447-8451.
35. Koltunow AM, Truettner J, Cox KH, et al. Different temporal and spatial gene expression patterns occur during anther development. *Plant Cell* 1990;2:1201-1224.
36. Tjaden G, Edwards JW, Coruzzi GM. *Cis* elements and *transacting* factors affecting regulation of a nonphotosynthetic light-regulated gene for chloroplast glutamine synthetase. *Plant Physiol* 1995;108:1109-1117.
37. Simpson SD, Nakashima K, Narusaka Y, et al. Two different novel *cis*-acting elements of *erd1*, a *clpA* homologous *Arabidopsis* gene, function in induction by dehydration stress and dark-induced senescence. *Plant J* 2003;33:259-270.
38. Zhou M, Ma J, Pang J, et al. Regulation of plant stress response by dehydration responsive element binding (DREB) transcription factors. *Afr J Biotechnol* 2010;9:9255-9279.
39. Lata C, Prasad M. Role of DREBs in regulation of abiotic stress responses in plants. *J Exp Bot* 2011; 62:4731-4748.
40. Jaglo KR, Kleff S, Amundsen KL, et al. Components of the *Arabidopsis* C-Repeat/Dehydration-Responsive Element Binding Factor Cold-Response Pathway Are Conserved in *Brassica napus* and Other Plant Species. *Plant Physiol* 2001;127:910-917.
41. Kagale S, Links MG, Rozwadowski K. Genome-wide analysis of Ethylene responsive element binding factor-associated Amphiphilic Repression (EAR) motif-containing transcriptional regulators in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 2010;152:1109-1134.
42. Shen Q, Zhang P, Ho THD. Modular nature of ABA response complexes: composite promoter units that are necessary and sufficient for ABA-induced gene expression in barley. *Plant Cell* 1996;7:1107-1119.
43. Shen QJ, Casaretto JA, Zhang P, Ho THD. Functional definition of ABA-response complexes: the promoter units necessary and sufficient for ABA induction of gene expression in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant Mol Biol* 2004;54:111-124.

44. Uno Y, Furihata T, Abe H, et al. *Arabidopsis* basic leucine zipper transcription factors involved in an abscisic acid-dependent signal transduction pathway under drought and high-salinity conditions. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:11632-11637.
45. Liu N, Zhong N/Q, Wang G-L, et al. Cloning and functional characterization of *Ppdbf1* gene encoding a DRE-binding transcription factor from *Physcomitrella patens*. *Planta* 2007;226:827-838.
46. Chinnusamy V, Ohta M, Kanrar S, et al. ICE1: a regulator of cold-induced transcriptome and freezing tolerance in *Arabidopsis*. *Genes Dev* 2003;17:1043-1054.
47. Borochoy A, Woodson WR. Physiology and biochemistry of flower petal senescence. *Hort Rev* 1989;11:15-43.
48. Tebbutt SJ, Lonsdale DM. Deletion analysis of a tobacco pollen-specific polygalacturonase promoter. *Sex Plant Reprod* 1995; 8:242-246.
49. Bate N, Twell D. Functional architecture of a late pollen promoter: Pollen-specific transcription is developmentally regulated by multiple stage-specific and co-dependent activator elements. *Plant Mol Biol* 1998;37:859-869.
50. Rogers HJ, Bate N, Combe J, Sullivan J, et al. Functional analysis of *cis*-regulatory elements within the promoter of the tobacco late pollen gene *g10*. *Plant Mol Biol* 2001;45:577-585.
51. Filichkin SA, Leonard JM, Monteros A, et al. A novel endo-betamannanase gene in tomato *LeMAN5* is associated with anther and pollen development. *Plant Physiol* 2004;134:1080-1087.
52. Chen L, Tu Z, Hussain J, et al. Isolation and heterologous transformation analysis of a pollen-specific promoter from wheat (*Triticum aestivum* L.). *Mol Biol Rep* 2010;37:737-744.
53. Moshkin VA. Castor. New Delhi: Amerind Publishing; 1986.
54. Snider JL, Oosterhuis DM, Loka DA, Kawakami EM. High temperature limits *in vivo* pollen tube growth rates by altering diurnal carbohydrate balance in field-grown *Gossypium hirsutum* pistils. *J Plant Physiol* 2011;168:1168-1175.